



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**TVAROVÁNÍ HYDROXYAPATITU NA MIKRO ÚROVNI PRO
PŘÍPRAVU KOSTNÍCH NÁHRAD**

SHAPING OF BIO CERAMIC HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS ON MICRO LEVEL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Pejchalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. David Salamon, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1156/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lucie Pejchalová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. David Salamon, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Tvarování hydroxyapatitu na mikro úrovni pro přípravu kostních náhrad

Zadání bakalářské práce:

Experimentálně ověřit možnost přípravy struktur vhodných pro přípravu kostních náhrad z hydroxyapatitu metodou freeze casting.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lucie Pejchalová
student(ka)

doc. Ing. David Salamon, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Vhledem k celosvětovému stárnutí populace, dochází k častější potřebě opravy pohybového aparátu. V některých případech je proto nutno přejít v konečné fázi k implantaci kostní náhrady. Nejčastěji je pro svoji biokompatibilitu a bioaktivitu využíván hydroxyapatit, který je v kostech přirozeně zastoupen.

Využití hydroxyapatitu jako materiálu pro kostní náhrady je omezeno mechanickou stabilitou v porézních systémech. Metoda, při které bylo dosaženo nejlepšího poměru mechanické stability a porozity, se nazývá freeze – casting. Tato metoda využívá tvorbu ledu (v případě vodných suspenzí) ke tvorbě lamelární struktury během kontrolovaného mražení. Dalším krokem je odstranění ledových krystalů lyofilizací. Následně je výsledná porézní lamelární struktura zpevněna slinutím. Změnou složení suspenze nebo podmínek mražení lze dosáhnout různé mezilamelární vzdálenosti, spojení lamel a porozity.

V této práci byly připraveny keramické suspenze v objemovém zastoupení hydroxyapatitu 7,5 %, 10 %, 15 % a 20 %, které byly použity při přípravě porézních kostních náhrad metodou freeze – casting. Během mražení byla do struktur implementována 3D mřížka, která posloužila jako šablona pro síť kanálků (v průměru cca 800 μm). Po lyofilizaci byly následným ohřevem odstraněny z materiálu organické látky, včetně 3D mřížky.

Výsledná biokeramická struktura dosáhla porozity víc než 90 % a velmi dobrého poměru mechanické stability a porozity. Implementace 3D mřížky se ukázala být vhodnou metodou pro kontrolovanou tvorbu kanálků s dostatečným rozměrem, sloužící k zvýšení bioaktivity materiálu.

ABSTRACT

Due to increasing average age of population around the world, there are more patients who need surgery of musculoskeletal system. In some cases, it is even necessary to implant new bone scaffold or replace joints. Hydroxyapatite is the most frequently used material for its biocompatibility and bioactivity.

On the other hand, mechanical properties constraints its use in porous scaffolds. The method providing both good mechanical stability and high porosity is freeze – casting. This method utilises controlled freezing to form lamellar structure. During freezing of slurry, ice crystals grow in direction of temperature gradient. In next step, ice crystals are removed by lyophilisation and lamellar structure is revealed. This structure is relatively unstable and needs to be reinforced by sintering. There are many aspects affecting resulting structure – freezing schedule, slurry concentration etc.

We used water/ceramic slurries in various concentrations of hydroxyapatite (7,5 % vol., 10 % vol., 15 % vol. and 20 % vol.). These slurries were used for preparation of porous bone scaffolds. We tried to add 3D mesh to form net of channels and we observed favourable changes in porosity. 3D mesh was removed during sintering.

Resulting bioceramics structure was highly porous (up to 90 %). These scaffolds had an acceptable ratio between porosity and mechanical stability, too.

We considered, adding of 3D mesh, as good way to form channels of desired properties.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydroxyapatit, biokeramika, freeze-casting, kostní implantát

KEY WORDS

Hydroxyapatite, bioceramics, freeze-casting, bone implant

PEJCHALOVÁ, L. *Tvarování hydroxyapatitu na mikro úrovni pro přípravu kostních náhrad*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 47 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. David Salamon, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Tvarování hydroxyapatitu na mikro úrovni pro přípravu kostních náhrad“ vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Davida Salamona, Ph.D. a uvedla v seznamu všechny použité literární a odborné zdroje. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. Ing. Davidu Salamonovi, Ph.D., za odborné vedení, vstřícný přístup a poskytování rad a připomínek během řešení mé bakalářské práce. Děkuji také panu Ing. Jakubu Rolečkovi za ochotu a praktickou pomoc při řešení mé bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Lidská kost	8
2.2 Biomateriály	12
2.3 Možné přístupy k přípravě požadovaných struktur scaffoldu	15
2.4 Metoda freeze – casting	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
3.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií.....	25
3.2 Příprava keramických suspenzí.....	25
3.3 Aplikace metody freeze – casting	27
3.4 Přelití připravených struktur hutnou vrstvou.....	30
3.5 Slinování	30
3.6 Měření hustoty a porozity připravených scaffoldů.....	31
3.7 Rtuťová porozimetrie	32
3.8 Rentgenová difraktometrie	32
4. VÝSLEDKY	33
4.1 Popis připravených scaffoldů.....	33
4.2 Obrazová analýza připravených scaffoldů	33
4.3 Hustoty scaffoldů.....	36
4.4 Porozita a distribuce pórů.....	36
4.5 Stabilita suspenzí	38
4.6 RTG difraktometrie	38
5. DISKUZE.....	39
6. ZÁVĚR.....	41
7. LITERATURA.....	42
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	47

1. ÚVOD

První kovové implantáty byly poprvé použity již ve 30. letech minulého století, kdy byl zaznamenán i rozvoj chirurgických technik. Dalším milníkem byly 60 a 70. léta minulého století. Profesor L. L. Hench a jeho kolektiv připravili speciální biomateriál – biosklo, a po tomto převratném objevu začal růst zájem a biokeramické materiály.

Biokeramika bývá využívána do kostních a zubních náhrad, ale také může být využita v dialyzačních přístrojích nebo respirátorů. Vědecké týmy v současnosti také zkoumají budoucí možnosti biokeramiky pro léčbu rakoviny [1].

Kost, jakožto orgán, poskytuje oporu a ochranu dalším orgánům, zajišťuje krevetvorbu a především, společně se svaly, umožňuje pohyb. Pokud dojde k narušení funkce pohybového ústrojí, je člověk buďto částečně nebo zcela imobilizován. Funkce kosti může být narušena genetickou mutací (Ehlers – Danlosův syndrom), drobnou až rozsáhlou frakturou, různými druhy onemocnění jako například paradentózou nebo osteoporózou, anebo jako důsledek jiných onemocnění (diabetes mellitus – následná amputace). V některých případech je proto nutno přejít v konečné fázi onemocnění k implantaci kostní náhrady [2, 3].

Při léčbě onemocnění kostního aparátu bývá hojně využívána biokeramika, především ve formě kostních implantátů. Biokeramika včetně bioskla, má významnou vlastnost – biokompatibilitu, díky které lze implantátem nahradit chybějící části kosti, bez výrazné imunitní odezvy organismu. Nejčastěji jsou voleny biokeramické materiály, které jsou složením podobné přirozeně se vyskytujícím materiálům v těle, ale lze zvolit jiné materiály, jako například oxidy kovů [1].

Populární jsou i funkčně gradientní materiály, což jsou heterogenní materiály, které v důsledku záměrné změny složení, vykazují změnu nějaké vlastnosti, například porozity. Toho lze využít pro přípravu kompozitů se zvýšenou odolností vůči opotřebením.

Důležitou roli v přípravě implantátu hraje jeho vnitřní struktura, jak na mikro, tak nano úrovni. U kostních implantátů je požadavek na co nejvyšší porozitu materiálu, za současného zachování mechanických vlastností. Podle potřeby pacienta je nutno zvážit, jaký implantát připravit. Existuje velké množství metod, kterými lze připravit rozmanité typy implantátů, které mohou mít různé vlastnosti, porozitu apod.

Nejčastěji je pro svoji biokompatibilitu a bioaktivitu využíván hydroxyapatit. V dnešní době se ale začínají využívat i anorganické polymery fosforečnanů, které mají lepší biologické vlastnosti než hydroxyapatit [1,4].

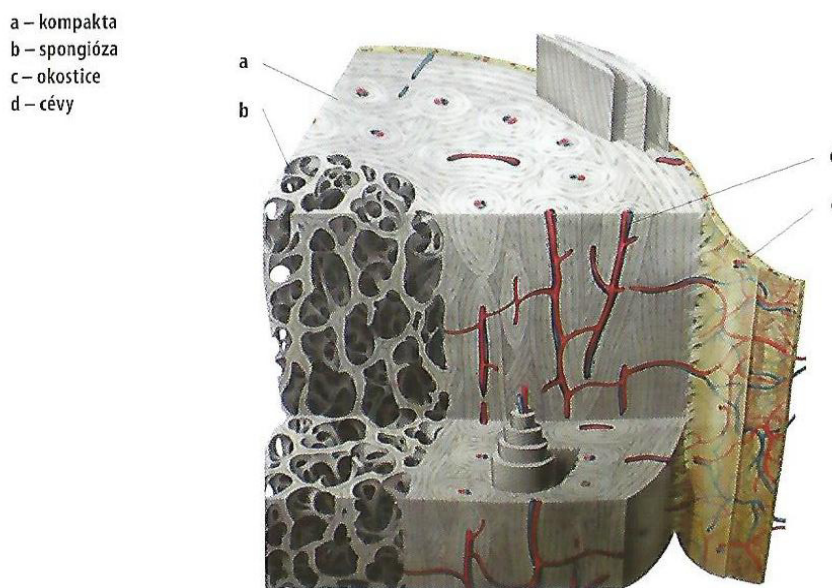
2. TEORETICKÁ ČÁST

První část bakalářské práce se zabývá problematikou lidské kosti, tedy její fyziologií, složením, růstem a látkovou výměnou. Druhá část je věnována nejčastěji používaným biomateriálům, hydroxyapatitu a oxidu zirkoničitému.

2.1 Lidská kost

2.1.1 Fyziologie lidské kosti

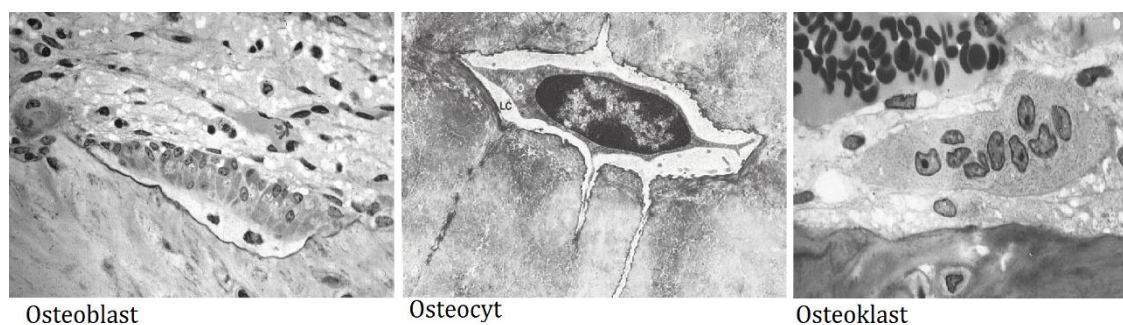
Kost je orgán tvořený specifickou formou pojivové tkáně. Základem pojivové tkáně jsou kolagenní vlákna, extracelulární matrix (mezibuněčná hmota) a minerální anorganická složka. Kostní tkáň je formována do zevní vrstvy – kompakty, která je poměrně hutná a vykazuje nižší metabolickou aktivitu. Přísun živin je v kompaktě zajištěn Haverskými kanálky, které jsou obklopeny vrstvami kolagenu (kruhovitě vrstvené lamely). Takto vzniklé válce se nazývají osteony. Vnitřní vrstva kostní tkáně se nazývá spongióza a je tvořena kostními trámci, které jsou oddělené volnými prostory. Potřebné živiny difundují z extracelulární matrix do všech trámců (Obrázek 1), [2 ,3].



Obrázek 1: Kostní tkáň [3].

Typická dlouhá kost je tvořena dvěma částmi – epifýzou (koncová část kosti) a diafýzou (středová část kosti). Uvnitř dlouhých kostí je dřevná dutina s kostní dření, která má krvevlivnou schopnost (zejména v plochých kostech, tzn. lopatce nebo žebrech). Kost je na povrchu kryta blánou zvanou periost, která zajišťuje krevní zásobení a inervaci kosti. Její vnitřní část obsahuje kostitvorné buňky, jejichž činností roste kost do šířky [3].

Kostní buňky, viz Obrázek 2, zajišťují především tvorbu a resorpci kosti. Osteoblasty tvoří kostní hmotu, do které se následně ukládají anorganické minerály. Osteoblasty tvoří především kolagen typu I, další proteiny kostní matrix a alkalickou fosfatázu. Pokud jsou osteoblasty obklopeny kalcifikovanou kostní hmotou, diferencují se na osteocyty. Třetím typem kostních buněk jsou osteoklasty, které pomáhají resorbovat dříve vytvořenou kost. Osteoklasty jsou pevně upevněny na kosti a pomocí prostředí s kyselým pH rozpouští hydroxyapatit, který endocytózou přechází do intersticiální tekutiny. Pomocí, osteoklasty produkované, kyselé proteázy pak rozpouští kolagen [2].



Obrázek 2: Kostní buňky [5].

2.1.2 Složení kosti

Kostní struktura zahrnuje organické i anorganické složky. Organickou část kosti zastupují především proteiny, zejména pak kolagen typu I. Proteiny se nachází v prostředí kostní hmoty. Proteiny tedy tvoří ossein – ústrojnou část kosti, která tvoří 30 % z celkové kostní hmoty. Minerální složky zahrnují sloučeniny vápníku, které se v kosti vyskytují nejčastěji ve formě hydroxyapatitů. Obecný vzorec těchto sloučenin je $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Další anorganické složky jsou pak tvořeny sloučeninami sodíku, hořčíku a uhlíčanů. Tato anorganická část činí kost tvrdou a tvoří 45 % z celkové kostní hmoty. Zbytek kosti je tvořen vodou (25%) [2, 3].

2.1.3 Tvorba a růst kosti

Kost vzniká mineralizací pojivové tkáně. Základem mineralizace je syntéza amorfního Ca/P, který je exocytózou vylučován z osteoblastů. Následná mineralizace kosti probíhá ve třech posloupných procesech:

- mineralizace matrix pomocí vezikulů,
- ulpívání minerálních krystalů na kolagenu,
- zrání krystalů s kolagenem,

které je regulováno rozpustnými nekolagenními proteiny. Jejich produkci zajišťují osteoblasty (osteopontin, osteocalcin, osteonectin a sialoprotein) a v menší míře osteoklasty (kostní morfogenetické proteiny).

Pro správný průběh mineralizace je důležitý metabolismus fosforečnanů. Na metabolismu fosforečnanů se zejména podílí enzym alkalická fosfatáza (ALP). Jeho zvýšená koncentrace je právě v místech osifikace. ALP pomáhá tvořit anorganické fosforečnany, které jsou využity pro tvorbu hydroxyapatitu. ALP se také účastní hydrolýzy enzymu, který inhibuje mineralizaci anorganickým pyrofosfátem, což ulehčuje růst a zabudování hydroxyapatitu do samotné kosti. Enzym ALP se v těle vyskytuje ve čtyřech isomerech a bývá používán jako biochemický marker při testování krevního séra a moči, při poruše reparace a remodelace kosti – osteoporóze.

Kosti se modelují z chrupavek, které se procesem osifikace postupně přemění v kost. Osifikace začíná v osifikačním centru, ze kterého postupuje dál. Centrum osifikace se nachází ve středu kosti a postupuje k oběma koncům. Během růstu se kost, díky aktivitě chrupavky na hlavici, prodlužuje na koncích [2, 3, 4].

2.1.4 Remodelace a látková výměna

Během života se kostní tkáň obnovuje a dochází k její remodelaci, která probíhá pouze v malých buněčných oblastech (remodelační jednotky), tak aby byla zachována funkce kosti. Remodelace je započata osteoklasty (resorpce), které jsou následovány osteoblasty (založení ‚nové‘ kosti). Při tomto metabolickém procesu jsou do krve vyplavovány a zpětně resorbovány minerální látky. Tento proces je ovlivněn námahou, tlakem, gravitací, slunečním zářením a příjmem vápníku, fosforu a vitamínu D.

Tvorba kosti je řízena především hormonálními hladinami v krvi, růstovými faktory a cytokininy. Pro správnou tvorbu kostí je tedy velmi důležitá správná funkce žláz s vnitřní sekrecí – hypofýzy, štítné žlázy a příštítných tělísek [3, 6].

Vápník a jeho metabolismus

V lidském těle je většina vápníku uložena právě v kostech. Volný a ionizovaný vápník, který se vyskytuje v tělesných tekutinách, je nezbytný pro srážení krve, svalovou kontrakci a funkci nervů. V kostech se vápník vyskytuje ve dvou formách:

- rychle směnitelná forma,
- pool stabilního vápníku,

který lze sice směnit, ale velice pomalu. Vápník se v těle účastní dvou zásadních procesů. Prvním z nich je pohyb rychle směnitelného vápníku a druhým procesem je kooperace resorpce a remodelace kosti, která u dospělého člověka probíhá v míře cca 18 % za rok.

Vápník je většinou resorbován ve střevě z potravy a pomocí aktivního transportu nebo pasivní difuze je distribuován dále v těle. Jeho resorpci snižují látky, které s ním vytváří nerozpustné soli. Metabolismus vápníku je v podstatě regulován třemi hormony (1,25 – dihydroxycholekalCIFerolem, parathormonem a kalcitocinem). V prenatálním vývoji se do

regulace zapojuje speciální protein PTH. Metabolické dráhy vápníku lze ovlivnit glukokortikoidy, růstovými hormony a růstovými faktory.

Jak již bylo zmíněno, vápník se ukládá do osteoblastů a tím vytváří kostní tkáň. Při příjmu vápníku z potravy zlepšuje vitamin D a jeho metabolity resorpci z tlustého střeva. Vitamin D vzniká v kůži savců působením slunečního záření a jeho následnou hydroxylací vznikají hormony regulující právě resorpci vápníku [2, 6].

Fosfor a jeho metabolismus

Fosfor je v těle zastoupen ve formě fosfátů v adenosintrifosfátu (ATP), cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a proteinech. V buňkách je součástí metabolických reakcí – fosforylace a defosforylace, které jsou velmi přesně regulovány. Velká část fosforu je zastoupena v kostech a krevní plazmě. Z těchto informací vyplývá, že většina sloučenin fosforu je organických. Anorganické sloučeniny se vyskytují převážně ve formě fosforečnanů, hydrogen – a dihydrogenfosforečnanů.

Resorpce fosforu probíhá ve dvanáctníku, tenkém střevě a ledvinách, kde je zajišťována aktivním transportem a pasivní difuzí. Metabolismus fosfátů je regulován podobnými hormony jako v případě vápníku [2, 6].

2.1.5 Onemocnění kostí

Onemocnění kostí mohou být vrozené, způsobené genovou mutací, metabolickou dysfunkcí nebo vnějšími faktory. Závažným zdravotním problémem, zejména pak v USA a Evropě, je osteoporóza, jejíž výskyt se zvyšuje především u starších lidí v populaci.

Mutace genů, které kódují kolagen, způsobují Osteogenesis imperfecta (nemoc křehkých kostí), jiné mutace pak vedou například k Ehlers – Danlově syndromu (heterogenní skupina chorob pojivových tkání, projevujících se např. hypermobilními klouby nebo postižením konkrétní pojivové tkáně), specifickým formám osteoporózy a osteoartritidy. [3]

Osteoporóza je onemocnění, při kterém se z pojivové tkáně ztrácí kostní hmota i minerální složka a tím klesá pevnost kostí (Obrázek 3). Převažuje tedy resorpce kosti nad tvorbou, což má za následek zvýšení počtu zlomenin distálního předloktí, obratlů a krčku kosti stehenní. V těchto kostech je vysoký výskyt spongiózní tkáně kosti, která z důvodu metabolické aktivity ubývá rychleji. Onemocnění se vyskytuje zejména ve stáří a po menopauze. Výrazněji se projevuje především u žen, které mají nižší objem kostní hmoty než muži. Léčba je prováděna estrogeny, které zastavují další postup onemocnění a inhibují sekreci cytokinů, které jsou zodpovědné za rychlejší úbytek kostní hmoty [2, 4].



Obrázek 3: Porovnání zdravé a osteoporotické kosti [7].

2.2 Biomateriály

Při přípravě kostních náhrad a scaffoldů, je v současnosti snaha o částečné napodobení charakteristických vlastností živých tkání (složení, strukturu, mechanické a chemické vlastnosti apod.). Scaffold je jakýsi podklad pro tvorbu vlastní tkáně a je tedy využíván v regenerační medicíně. Trendem tedy není kost pouze nahradit syntetickým materiálem, ale poskytnout kosti podporu pro regeneraci a stimulovat růst nové kostní hmoty.

Scaffoldy jsou ve většině případů připraveny buď z organických nebo anorganických materiálů. Na tyto materiály jsou kladeny vysoké nároky, protože jsou umístěny do fyziologického prostředí, přichází tedy do přímého styku s živou tkání. Biomateriály tedy musí splňovat základní podmínky:

- biokompatibilitu,
- bioaktivitu,
- mechanickou odolnost (pevnost v tlaku a tahu),
- případnou resorbovatelnost [1, 8, 9].

Biokompatibilita připraveného scaffoldu vyjadřuje snášenlivost s fyziologickou tkání. Organismus si totiž při implantaci scaffoldu vytváří protilátky a daný implantát tělo nemusí přijmout. Scaffold připravený z biomateriálu musí tedy vykazovat určité chování ve fyziologickém prostředí. Pokud se nespustí imunitní reakce a nedojde k infekci, organismus implantát přijme bez větších komplikací.

Bioaktivita materiálu tvoří rozhraní mezi resorbovatelností a inertností použitých biomateriálů, kdy po implantaci dochází k vytvoření přímé vazby mezi implantátem a tkání.

Většina materiálů, které vykazují dobré biologické vlastnosti, nemají příliš dobrou úroveň mechanických vlastností. Jejich největší nevýhodou bývá jejich velká křehkost, proto je

důležité připravit scaffold vhodnou metodou, tak aby byla vytvořena co nejodolnější struktura [9, 10].

Resorbovatelnost je charakteristickou vlastností, která napomáhá obnově vlastní kostní tkáně. Resorbovatelné materiály tedy poskytují „stavební“ materiál při procesu regenerace. Z těla jsou pak odstraněny buněčnou aktivitou nebo se rozpustí ve fyziologickém prostředí, bez výskytu toxických metabolitů [4].

2.2.1 Biokeramika a biosklo

Keramické scaffoldy jsou hojně využívány zejména díky své biokompatibilitě, odolnosti proti korozi, nebo složení, protože určitý podíl je tvořen minerální složkou, stejně tak jako v kosti. Všeobecně je biokeramika lehce biologicky odbouratelná, netoxická a odolná. Nevýhodou je její křehkost a obtížná výroba.

Biokeramiku lze použít při výrobě zubních povlaků, implantátů nebo kostních plniv. Mezi biokeramické materiály se řadí polykrystalické keramiky, bioskla a bioaktivní kompozity. Všechny zmíněné materiály mohou být vyráběny v různých formách (pěny, granule, povlaky apod.).

Keramické materiály, které lze použít na výrobu implantátů, můžeme dělit podle působení na živou tkáň:

- neresorbovatelná keramika (oxid hlinitý (Al_2O_3), oxid zirkoničitý (ZrO_2))
- bioaktivní keramika (hydroxyapatity)
- resorbovatelná keramika (fosforečnan vápenatý ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)) [1, 9].

V současnosti jsou všechny tyto materiály velmi využívány. Současné frekventovanosti využívání biokeramiky a biomateriálů obecně, předchází rozsáhlé testy a studie, přičemž před uvedením na trh musí daný materiál projít důkladnou kontrolou Úřadem pro kontrolu léčiv (US Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA)). Jakýkoliv výzkum je přitom velmi časově a finančně náročný.

Jako biosklo je označován typ bioaktivní skel, skládajících se ze SiO_2 , Na_2O , CaO a P_2O_5 . Poměr zastoupení jednotlivých složek, který je odlišný od normálního skla, má za následek specifické vlastnosti tohoto materiálu. Největší výhodou bioskel je vysoká bioaktivita a nevyskytující se tendence formovat fibrózní tkáň. Nevýhodou je ale nízká mechanická pevnost. Nejznámějším typem je Bioglass 45S5. Biosklo bylo poprvé připraveno v 60. letech ve Spojených státech, původně pro zlepšení regenerace kosti. Vzhledem k nízké mechanické pevnosti bylo využíváno především jako náhrada malých kostí (sluchových kůstek). V dnešní době je na trhu dostupné rozmanité množství typů bioskel, které mají různé využití, řídící se podle zastoupení jednotlivých složek. Lze je využít například pro povlakování kovových implantátů [1].

Hydroxyapatit (HA)

Hydroxyapatit je jedním z typů orthofosforečnanu vápenatého, se sumárním vzorcem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Je velmi biokompatibilní a bioaktivní. Přirozeně se vyskytuje ve formě krystalického minerálu (různě zbarveného). V lidském těle je jednou z nejvýznamnějších složek kostí a zubů, jelikož hydroxyapatit tvoří cca 70 % hmotnosti kostní tkáně.

Kvůli svým horším mechanickým vlastnostem (zejména křehkosti) nelze HA použít na přípravu implantátů do nosných a často zatěžovaných oblastí. Implantáty z hydroxyapatitu lze tedy použít do méně zatěžovaných oblastí, jako je střední ucho, výplně kostních defektů (kostní štěpy) a dentálních implantátů. Ve formě kompozitů lze hydroxyapatit využít v dentální chirurgii a jako povrchovou vrstvu kovových protéz. Pro chirurgii oblasti tváře a horní čelisti, je hojně využíván tvar destiček [4, 8].

Hydroxyapatit je dostupný v různých formách – granule, prášek, bloky, scaffoldy a destičky, které jsou oblíbené kvůli možnosti přetvarování (řezání, broušení).

HA může být připraven různými druhy syntéz – mokřými metodami (sol-gel, emulzní syntéza, precipitační metoda). Podle způsobu přípravy a zvolených parametrů se výsledné částice HA navzájem morfologicky liší [1, 10].

Oxid zirkoničitý (ZrO_2)

Oxid zirkoničitý se vyskytuje ve třech formách krystalové mřížky (kubická, monoklinická a tetragonální). ZrO_2 používaný pro kostní scaffoldy má tetragonální krystalovou mřížku. Keramické scaffoldy připravené z oxidu zirkoničitého vykazují velmi dobré mechanické vlastnosti – relativně vysokou pevnost, a díky své částečně stabilizované tetragonální struktuře, která zvyšuje jeho lomovou houževnatost. Struktura oxidu zirkoničitého bývá většinou částečně stabilizována 3 molárními % oxidu yttritího (Y_2O_3). Důvodem stabilizace je vytvoření určitého množství tetragonální fáze v mřížce. [1, 11].

Výhodou oxidu zirkoničitého je kromě jeho mechanických vlastností i biokompatibilita. Mírnou nevýhodou je ovšem určitý stupeň bioinertnosti. Ani po delší době, expozice scaffoldu fyziologickému prostředí nedochází ke změně jeho chemického složení. Zajímavé ovšem je, že dochází k mírnému snížení houževnatosti. Důvodem je změna části ZrO_2 z tetragonální na monoklinní fázi, což je způsobeno tím, že po implantaci mohou ve scaffoldu časem vzniknout mikropraskliny a voda přítomná v tělních tekutinách způsobuje jejich erozi.

ZrO_2 je také vhodný pro přípravu keramických kompozitů, protože vykazuje vysokou odolnost vůči opotřebení, neštěpí se a dá se barvit, což je jeho velkou výhodou při přípravě zubních implantátů. Je také využíván jako součást implantátu kyčelního kloubu s životností 15-20 let [1, 12].

2.2.2 Kompozity

Kompozitní materiály, vychází z kombinace dvou různých materiálů, čímž může vzniknout materiál s lepšími vlastnostmi, než jsou vlastnosti jednotlivých složek. Kompozity jsou tedy dostatečně pevné, biokompatibilní, inertní a mají vhodné biologické vlastnosti v rámci celého scaffoldu. Požadavky na kompozit klade budoucí hostitelská tkáň, tzn. složení, mechanické vlastnosti, resorbovatelnost apod. Nedostatkem kompozitů je ale náročnější výroba [4, 10].

Kompozity typu keramika/polymer mají nejčastěji polymerní jádro (polylaktid (PLA), polyglykolid (PGA), přírodní polymery) potažené vrstvou keramiky (fosforečnanu vápenatého, HA, ZrO_2), která usnadňuje osteoindukci. Nejprve je vždy připraven nanoporézní scaffold, ten je poté ponořen do simulované tělní tekutiny, což je tekutina jejíž koncentrace iontů je velmi podobná koncentracím iontů v krevní plazmě, má fyziologické pH a teplotu, a v ní ní začne probíhat krystalizace HA nebo fosforečnanu v celém objemu scaffoldu. Takto připravený kompozit lze použít například při reparaci kostí v oblasti chrupavek [8, 10].

Druhým typem kompozitů je typ keramika/keramika. Kombinace vhodných typů keramických materiálů zásadně ovlivňuje vlastnosti připraveného scaffoldu. Většina druhů keramických materiálů vykazuje nedostačující mechanické vlastnosti (pevnost v tlaku a tahu, houževnost), které lze přípravou kompozitu nebo volbou vhodné metody eliminovat. Tento typ kompozitů má nejčastěji jádro z oxidu zirkoničitého, které je potaženo biologicky aktivním materiálem, jako je fosforečnan vápenatý. Další možností je jádro z oxidu zirkoničitého, které je stabilizováno sklokeramickým potahem. Pevnost a pružnost kompozitu je tak několikanásobně vyšší než u samostatně připraveného ZrO_2 . Další možností je zirkoniová pěna, potažená HA s mezivrstvou fluorapatitu, pro mechanickou stabilizaci. Odlišným typem kompozitu je kompozit s HA jádrem [1, 11, 12].

Existuje mnoho dalších variant kompozitů, které lze připravit. Zvolený typ závisí na potřebách pacienta, výskytu a typu defektu kosti.

2.3 Možné přístupy k přípravě požadovaných struktur scaffoldu

Na základě potřeb pacienta a volby materiálu je nutné zvolit vhodnou metodu přípravy adekvátní struktury scaffoldu. Základem struktury scaffoldu jsou póry, které mohou mít různý tvar, orientaci, a distribuci. Volba metody přípravy tedy závisí na tom, jakého poměru mezi porozitou a požadovanými vlastnostmi je při přípravě scaffoldu nutno dosáhnout.

Všeobecný postup přípravy je založen na vytvoření zeleného keramického tělesa, případném sušení, odstranění pojivových složek ze zeleného tělesa a slinování [9, 13, 14].

2.3.1 Replikační metoda

Replikační metoda je založena na namáčení šablony v keramické suspenzi. Použitá šablona může být syntetického nebo přírodního původu. Poté se vrstva suspenze nechá

zaschnout na šabloně, která je při následném slinutí odstraněna a vzniká tak dutá porézní struktura. Správným teplotním gradientem schnutí i slinování lze předejít vzniku prasklin, v jejichž důsledku by výsledná struktura měla nedostatečné mechanické vlastnosti. Replikační metodu lze využít pro přípravu různých tvarů s rozmanitou porozitou (40-90 %) a s různou velikostí pórů (200 μ m – 3 mm) [15, 16].

2.3.2 Solid free form fabrication

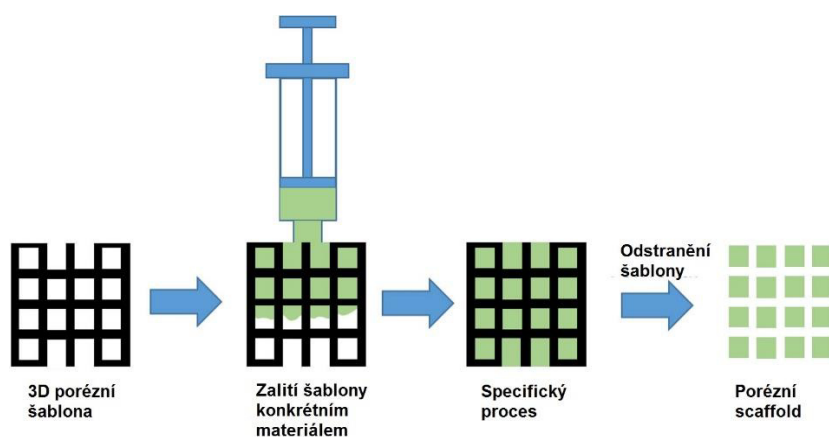
Základem solid free-form fabrication technik je výroba komplexních 3D keramických předmětů, bez využití formy, kdy celý proces zahrnuje pouze nanášení jednotlivých vrstev keramické suspenze. Předmět je nejprve navrhnout v programech typu CAD, na základě medicínských zobrazovacích technik. Díky tomuto postupu, lze připravit implantát přímo na míru konkrétního pacienta [17].

Solid free-form fabrication techniky jsou velmi hojně využívány v kombinaci s klasickými metodami přípravy scaffoldů. Časté je také využití přípravy šablony nebo formy, která je poté odstraněna.

Soubor technik lze rozdělit do tří skupin, na základě typu přístroje. První skupinou jsou metody založené na ozařování, kdy na základě 3D návrhu je při tvorbě objektu do výchozího materiálu dodávána energie, buďto ve formě světla (stereolitografie) nebo tepla (selective laser sintering). Druhá skupina zahrnuje metody využívající speciální trysku, k nanášení jednotlivých vrstev materiálu (fused deposition modelling). Poslední skupinou jsou metody, které využívají tisk různých materiálů.

Ve všeobecnosti, je prvním krokem tiskových metod, návrh předmětu v 3D programu typu CAD, vytvořený na základě CT screeningu. Poté jsou pomocí konkrétního zařízení nanášeny jednotlivé vrstvy materiálu (layer-by-layer). V případě tisknuté keramiky je nejprve nanесena vrstva keramického prášku a poté je nanесeno rozpouštědlo s pojivovou složkou. Další variantou je nanášení vrstev keramické suspenze, přičemž každá vrstva může být vytvrzena UV zářením. Tento proces se několikrát opakuje a v konečné fázi je keramika slinuta, případně jinak upravena.

3D tisk lze také využít pro přípravu polymerní šablony, která následně v kombinaci s jinou metodou přípravy keramických těles umožní, vytvořit scaffold s více zónami s rozdílnými mechanickými vlastnostmi a porozitou. Tento typ procesu je nazýván indirect rapid prototyping. Takto připravený scaffold zahrnuje tedy hutnou i porézní složku, tak jako reálná kostní tkáň (Obrázek 4) [17].



Obrázek 4: Schéma procesu indirect rapid prototyping [17].

2.3.3 Metoda pórotvorné látky

Metoda pórotvorné látky je založena na přípravě dvoufázové keramické suspenze, která se skládá z keramických částic dispergovaných v roztoku a polymerní složky. Polymerní složka je během procesu využita pro vznik pórů a současně jako pojivo. Suspenze a polymerní šablona jsou po celou dobu procesu umístěny ve formě. Polymerní složka může být syntetického i přírodního původu (škrob, celulóza). Po vytvoření scaffoldu je třeba polymerní šablonu odstranit takovým způsobem, aby nedošlo k narušení připravených pórů. Při slinování pak dojde k finálnímu zpevnění výsledné struktury. Dalšími variantami je i využití kovů, solí nebo oleje jakožto pórotvorných látek, ale cesta jejich odstranění je nejčastěji pouze chemická. Touto cestou lze vytvořit póry, které jsou navzájem propojeny, různě distribuovány a mají různou velikost [15, 18].

Mezi další techniky z této skupiny metod lze také zařadit freeze-casting, nebo naopak techniky využívající vysokoteplotní úpravy [15].

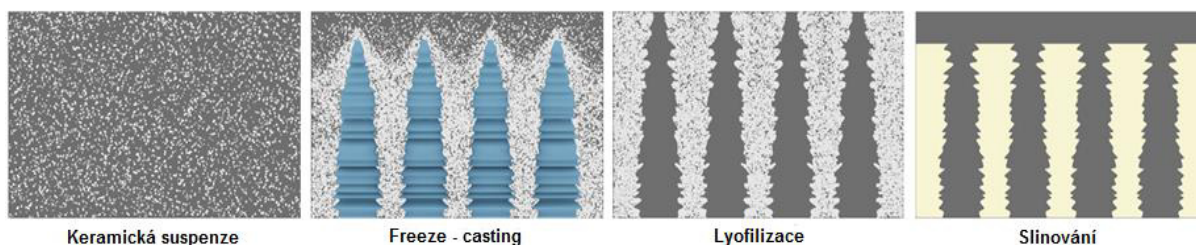
2.3.4 *In situ* metoda

Metoda *in-situ* napěnění využívá přímého vmíchání plynu do suspenze. Od množství vmíchaného plynu se odvíjí celková porozita. Připravená pěna je z důvodu vlhkosti nestabilní, a proto je důležité ji stabilizovat, aby nedošlo k nárůstu velikostí pórů. Stabilizaci lze provést například pomocí povrchově aktivními látkami. Stabilizace je uskutečněna dlouhými řetězci, které obsahují lyofilní nebo lyofobní skupiny (chemikálie pod názvem Triton). Výsledná struktura má pak dobré mechanické vlastnosti [15].

2.4 Metoda freeze – casting

Principem této metody je využití suspenze, obsahující keramické částice, při kontrolovaném mrznutí. Keramická suspenze je vystavena kontrolovanému mrznutí, při kterém se vytváří krystaly rozpouštědla. Vznikající krystaly rozpouštědla odsouvají pevné keramické částice na stranu, čímž vzniká porézní struktura. Mrznutí je prováděno v optimálním teplotním gradientu a pouze v jednom směru. Vzniklé krystaly rozpouštědla se následně ve vakuu nechají sublimovat – lyofilizace. Celý proces freeze-castingu, od keramické suspenze až po slinutý porézní scaffold je zobrazen na Obrázku 5.

Metodou freeze-casting lze připravit různé porézní struktury, pro jejichž výrobu lze využít nespočet různých keramických materiálů – Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 , tri-calcium fosfát nebo hydroxyapatit. Základní podmínkou je, že částice všech těchto materiálů musí být dobře dispergovatelné v suspenzi, s co nejmenší tendencí sedimentace, nebo případné chemické reakce [19, 20].



Obrázek 5: Schéma freeze-casting procesu.

2.4.1 Používaná rozpouštědla

Pro metodu freeze-casting mohou být využita různá rozpouštědla. Mezi nejpoužívanější pak patří voda, kamfen, *tert*-butyl alkohol nebo dioxan. Z pohledu rozdílných fyzikálních vlastností těchto látek, zejména pak teplot tuhnutí, viz Tabulka 1, je při přípravě suspenzí při laboratorní teplotě nejlépe použitelná voda, která je také nejvyužívanějším rozpouštědlem při aplikaci metody freeze-casting. Při použití jiných rozpouštědel je nutné nastavit jiné teplotní podmínky (vyšší teploty) a práce s nimi je tak komplikovanější [20].

Při vzniku krystalků ledu dochází k vývinu tlaku na keramické částice, které jsou rostoucími krystalky odsouvány na stranu, čímž dochází k tvorbě lamelární struktury. Voda, jako rozpouštědlo, je využívána také z důvodů ekonomických a enviromentálních. Její nevýhodou jsou ovšem některé vlastnosti – rychlé změny pH, pomalé odpařování nebo vysoké povrchové napětí [20].

Při použití organických rozpouštědel s vysokými body tání, je nutné splnit několik požadavků, aby byl freeze-casting efektivní:

- teplota tuhnutí, by měla být vyšší než laboratorní teplota

- viskozita rozpouštědla by měla podobná viskozitě vody (příprava stejně koncentrovaných suspenzí)
- hodnota tlaku vhodného pro vypaření rozpouštědla během lyofilizace

Kamfen je olejovitá kapalina s vysokým bodem tání. Je to bezpečné a přírodní rozpouštědlo. Bod tání je 45 °C a při laboratorní teplotě se jedná o pevnou krystalickou látku. Freeze-casting je vhodné aplikovat pouze na velmi zředěné suspenze.

Terc-butyl alkohol poskytuje, po vymražení a lyofilizaci, dlouhé póry, ve tvaru kanálků. Teplota tání je 25 °C. Lyofilizaci lze provádět, až při teplotě nad 80 °C [20, 21].

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti vybraných rozpouštědel [20].

rozpouštědlo	hustota [g·cm ⁻³]	bod varu [°C]	bod tuhnutí [°C]	povrchové napětí [mN·m ⁻¹]
voda	1,0	100	0,0	73,1
kamfen	0,8	155	44,9	sublimuje
<i>terc</i> -butyl alkohol	0,8	82,5	25,3	20,7

2.4.2 Aditiva v keramických suspenzích

Aditiva bývají nejčastěji přidávána do rozpouštědel v keramických suspenzích. Do vodných keramických suspenzí lze přidat kryoprotektanty. Tyto látky většinou posouvají bod tuhnutí vody, mohou snižovat velikost vznikajících ledových krystalů a upravují tak velikost pórů. Použité kryoprotektanty by měly být rozpustné ve vodě, netoxické, s optimální hodnotou posunu bodu tuhnutí apod.

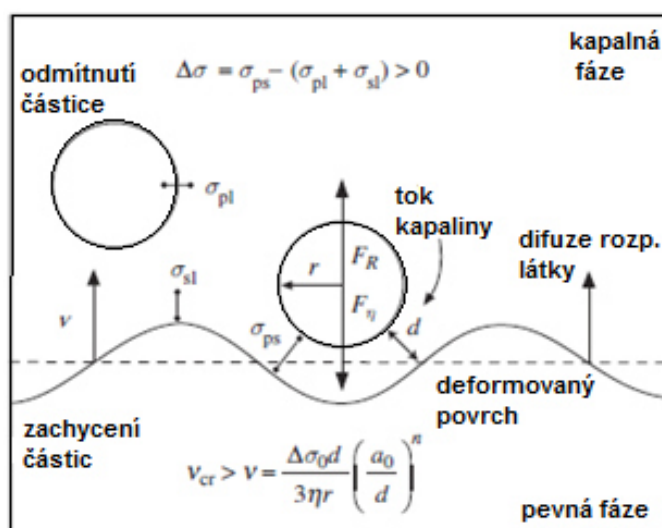
Příkladem je přídavek glycerolu do vodné keramické suspenze. Ve vhodném poměru, vody a glycerolu, lze dosáhnout bodu tuhnutí suspenze při -9,6 °C a také snížení objemové roztažnosti vody o 5 %.

Jiná aditiva umožňují kontrolovat tvar vznikajících pórů. Tato kontrola probíhá na základě změny morfologie vznikajících ledových krystalů a do značné míry ovlivňuje mechanické vlastnosti připravených scaffoldů. Vznikající ledové krystaly mohou mít různou tloušťku, což ovlivňuje velikost mezilamelárních prostor. Dále může být jejich povrch zdrsňelý v důsledku vzniku dendritických výstupků na povrchu lamel, případně může dojít až ke vzniku mezilamelárních můstků (přídavek sacharózy). Naopak při přídavku jiných aditiv může být povrch lamel hladký, bez jakéhokoliv zdrsňení. Další aditiva pak mohou změnit lamelární strukturu na celulární (kyselina citrónová) [22,23].

Takto lze použít různé polymery, dioxan, sacharózu, kyselinu citrónovou, chlorid sodný nebo ethanol. Všechny tyto přidané látky jsou odstraněny, po lyofilizaci, žíháním nebo přímo slinováním [22].

2.4.3 Proces mrznutí

Rychlost růstu ledových krystalů udává rychlost mrznutí. Zvolená rychlost mrznutí souvisí i s efektivitou odsouvání částic. Během mrznutí totiž může dojít k jejich uzavření mezi rostoucí led, což vede k defektům a zabránění vzniku požadované porézní struktury. Právě volba teplotního gradientu, v keramické suspenzi ovlivňuje výslednou strukturu a mechanické vlastnosti připraveného scaffoldu. Při mrznutí je keramická částice ovlivňována interakcemi přitažlivých a odpuzivých sil, které vznikají na rozhraní pevná látka – kapalina. Hodnota poměru sil pak udává kritickou rychlost mrznutí, tedy zde bude částice zachycena ve vznikajícím ledu, nebo bude odsunuta na stranu od vznikajícího ledového krystalu (Obrázek 6) [24].



Obrázek 6: Schématické znázornění interakcí mezi částicemi a kapalnou fází při freeze-castingu [24].

Proces mrznutí suspenze lze rozdělit do tří zón:

- počáteční zóna,
- přechodová zóna,
- zóna růstu pravidelných lamel.

V počáteční zóně dochází ke tvorbě prvních ledových krystalů. Těsně před vznikem ledových krystalů, se suspenze nachází v nestabilním podchlazeném stavu. V té chvíli začne docházet k velmi rychlé tvorbě ledových krystalů. Růst ledových krystalů je tak rychlý, že částice jsou zachyceny v ledu a vzniká tak hutná vrstva keramických částic [25].

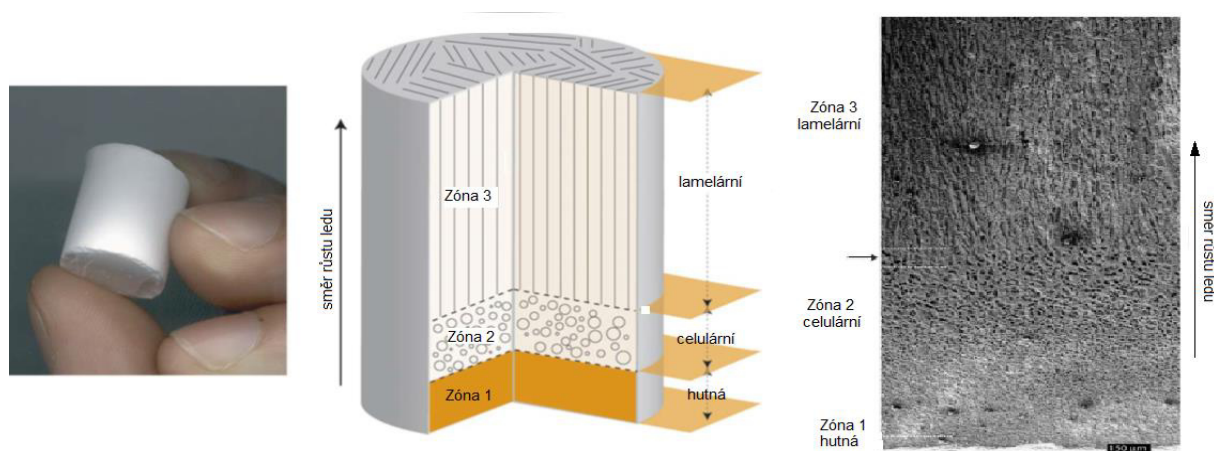
V přechodové zóně dochází ke změně mikrostruktury. Zpomaluje se růst ledových krystalů a rychlost jejich tvorby se stává konstantní. Ledové krystaly začínají odsouvat keramické částice na stranu a krystaly rostou ve dvou směrech:

- ve směru mrznutí (z-krystaly), za vzniku lamelární struktury,
- v radiálním směru (r-krystaly),

r-krystaly v přechodové zóně buďto postupně přestanou růst, nebo se změní na z-krystaly. K této změně dochází proto, že z pohledu termodynamiky a energie, je pro krystaly výhodnější se sladit s teplotním gradientem uvnitř promrzající suspenze [25, 26].

Ve třetí zóně dochází ke stabilnímu růstu ledových krystalů. Mezi rostoucími ledovými krystaly dochází k tvorbě lamel z keramických částic, jejichž tloušťku lze ovlivnit rychlostí mrznutí [27, 28].

Výsledná porézní struktura má z větší části lamelární charakter. Na Obrázku 7 je ukázána celková struktura, která je rozdělena do tří zón. V první zóně je pouze hutná vrstva keramické suspenze, přičemž tento negativní jev lze částečně eliminovat podchlazením forem na počátku teplotu freeze-castingu. Ve druhé zóně se během mrznutí vytváří částečná celulární struktura, začínají se formovat první lamely, a její výšku lze snížit vhodným teplotním gradientem, stejně tak jako přechod mezi touto celulární a lamelární zónou. Třetí zóna je pak už čistě lamelární [29].



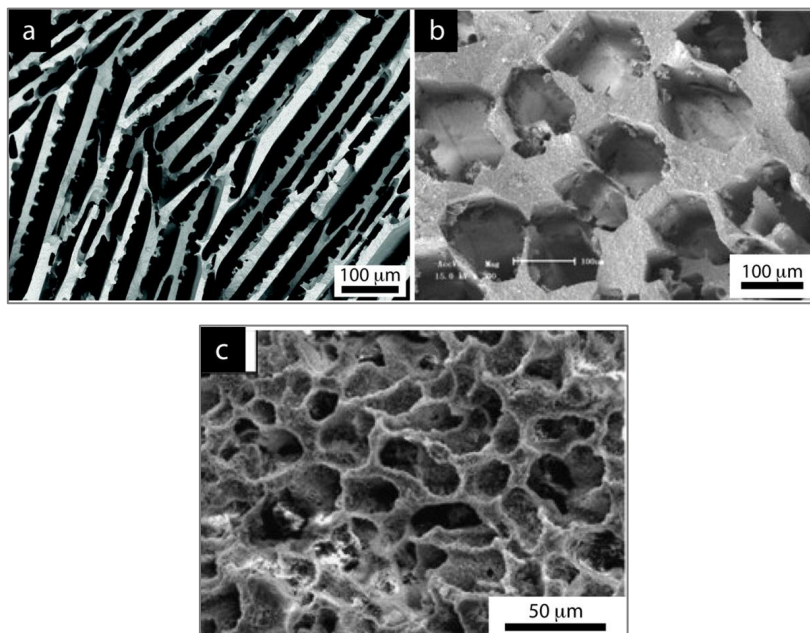
Obrázek 7: Typický příklad struktury vytvořený metodou freeze-casting [29].

2.4.4 Ovlivnění výsledné struktury

Jedním z faktorů, ovlivňujících proces růstu krystalů ledu, je velikost částic. Částice, které nejsou dostatečně velké nemusí být odsunuty tvořícím se krystalkem a brání tak vzniku požadované struktury. Na druhou stranu ovšem při menší velikosti keramických částic lze dosáhnout rovnoměrnější mikrostruktury. Zvýšení koncentrace částic v suspenzi pak snižuje výslednou porozitu scaffoldu [30].

Tvar výsledných pórů lze velmi výrazně ovlivnit volbou rozpouštědla. Při použití vody, jako rozpouštědla, hraje roli fakt, že krystaly ledu jsou při růstu ovlivněny směrem působení chladu.

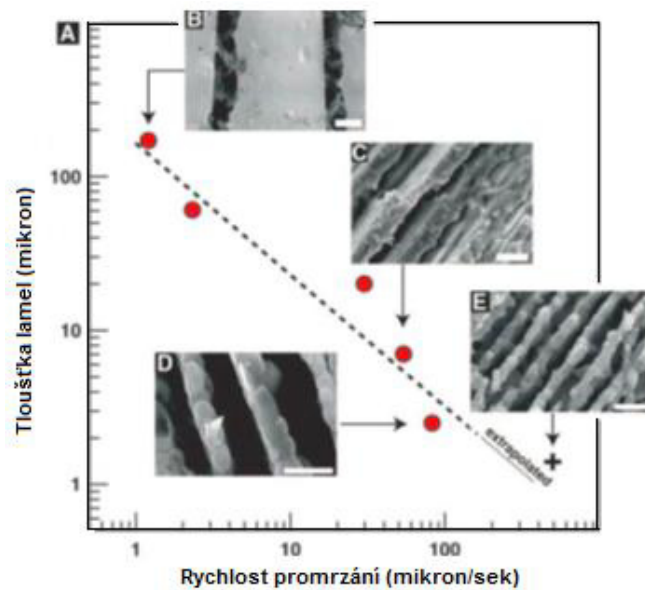
Proto je důležité, aby byl při mrznutí zvolen a dodržován pouze jeden směr a vznikla tak správně orientovaná lamelární struktura. Při použití jiných rozpouštědel vznikají především celulární póry (kamfen) nebo hexagonální póry (TBA), rozmanité velikosti (Obrázek 8) [20].



Obrázek 8: Výsledná mikrostruktura při využití různých rozpouštědel při freeze castingu keramiky z Al_2O_3 ; (a) voda, (b) TBA, (c) kamfen [20].

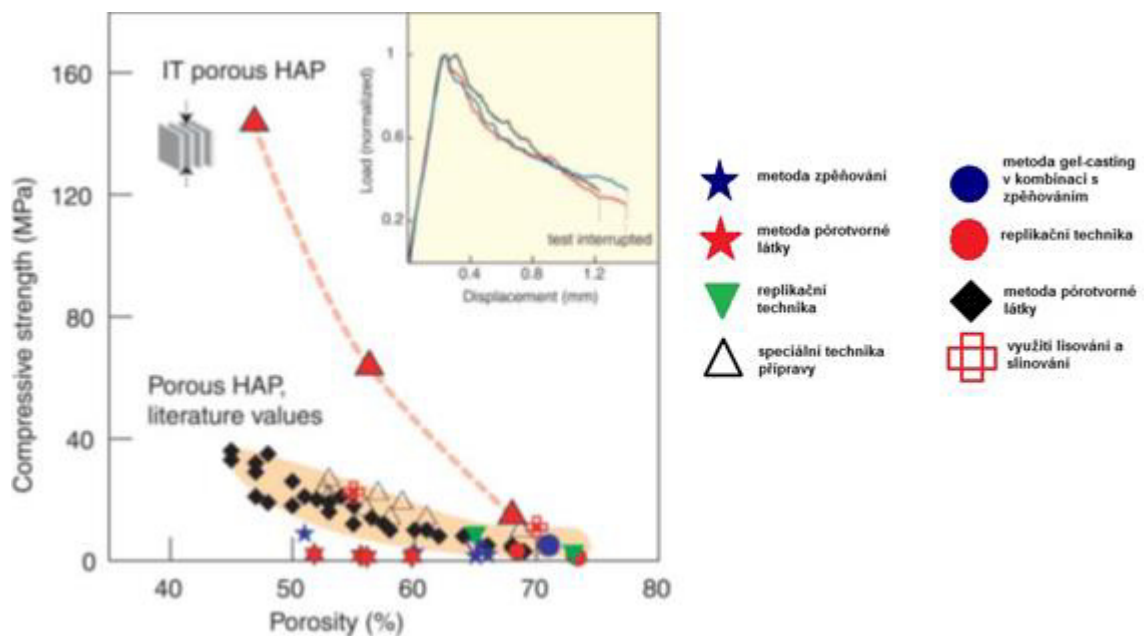
Změnou rychlosti mrznutí a teplotního gradientu v mražené suspenzi lze měnit velikost mezilamelárních prostor a tloušťku lamel v připraveném scaffoldu. Tloušťka lamel je ovlivněna především rychlostí mrznutí. Při vyšší rychlosti mrznutí jsou lamely užší, ale je jich vytvořeno více (Obrázek 9).

Vznik mezilamelární mřížky bývá dosažen pomocí aditiv, jako je sacharóza. Mezilamelární mřížky zvyšují mechanickou odolnost scaffoldu. Důležitým parametrem je také dosažení dostatečné velikosti mezilamelárních prostor, kvůli dobré integraci vlastních kostních buněk do implantátu [30].



Obrázek 9: Grafické znázornění závislosti tloušťky lamel na rychlosti mrznutí [30].

Pomocí metody freeze-casting lze dosáhnout mechanicky velmi odolných scaffoldů. U testů s hydroxyapatitem bylo prokázáno, že při použití metody freeze – casting lze dosáhnout mechanicky až čtyřnásobně odolnějšího scaffoldu než při použití jiných metod. Porovnání výsledků studie provedené výzkumným týmem Sylvaina Deville s výsledky prací, využívající jiné metody přípravy scaffoldů je ukázáno v Obrázku 10 [30].



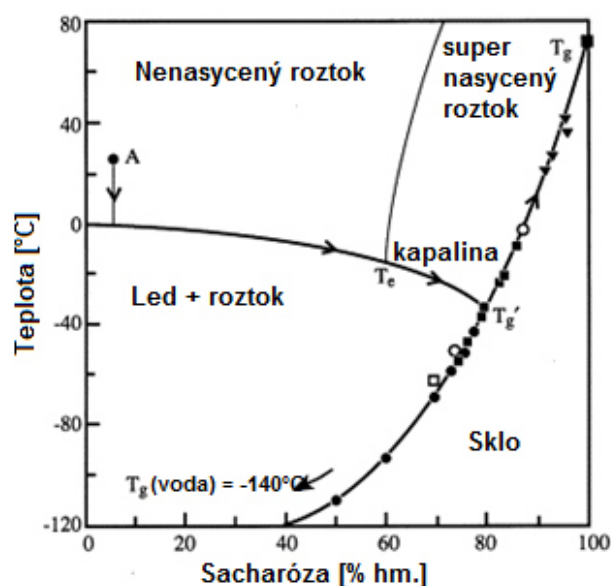
Obrázek 10: Grafické znázornění závislosti pevnosti v tlaku na porositě [30].

2.4.5 Lyofilizace

Lyofilizace je krokem, který následuje ihned po freeze-castingu a je nedílnou součástí celého procesu. Vzniklý led je při lyofilizaci sublimován, a tak odstraněn ze scaffoldu, bez poškození vytvořené struktury. Tento krok, z celého procesu trvá nejdéle.

Lyofilizaci lze rozdělit do dvou dílčích procesů. Prvním je sublimace vzniklých ledových krystalů. Během tohoto kroku je za sníženého tlaku do zmrzlého scaffoldu přiváděno teplo. Vodní páry poté putují strukturou k povrchu a jsou běžící vývěvou odváděny pryč. Druhým dílčím krokem je pak desorpce vody ze scaffoldu, která nezamrzla a nevysublimovala [31].

Jak již bylo zmíněno, do vodných suspenzí pro freeze-casting lze přidat sacharózu, která upravuje vznikající mikrostrukturu. Vzniklý binární systém sacharóza-voda sice dosahuje fázové rovnováhy, ale přidaná sacharóza během mrznutí nekrytalizuje. Sacharóza přechází do ještě nezmrzlé vody, čímž se roztok stává koncentrovanějším (Obrázek 11). Takto vysoce viskózní a koncentrovaný roztok následně zatuhne a vytvoří amorfní krystalickou fázi (sklo). Při lyofilizaci je tedy třeba počítat také s teplotou skelného přechodu T_g . Po celou dobu lyofilizace je nutné držet se pod touto teplotou, dokud nedojde k vysublimování dostatečného množství ledu. Pokud se teplota při lyofilizaci dostane nad T_g , dojde k prudkému nárůstu viskozity skelné fáze a poškození vytvořené porézní struktury [23, 32].



Obrázek 11: Fázový diagram binárního systému voda-sacharóza [23].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

3.1.1 Přístroje

- Přesné váhy METTLER TOLEDO
- chladicí deska Medite
- lyofilizátor
- vysokoteplotní pec CLASIC
- stereolupa ZEISS
- elektronový mikroskop FIB/SEM Tescan Lyra3
- hustoměr pro analytické stanovení hustoty METTLER Density Kit
- rtuťový porozimetr Poremaster Pm-60-18 (Quantachrome Instruments)
- RTG práškový difraktometr Rigaku SmartLab 3kW

3.1.2 Chemikálie

Tabulka 2: Použité chemikálie.

Chemikálie	Mr	Čistota	Výrobce	CAS
Polyvinylalkohol (PVA)	61,00	99,5 %	Sigma – Aldrich	9002-89-5
Dolapix CE64	-	-	Zschimmer & Schwarz Group	-
Darvan C-N	-	-	Vanderbilt Holding, Inc.	30875-88-8
Sacharóza	342,27	~90 %	-	57-50-01
Oktanol	130,23	99,7 %	Fluka chemistry	111-87-5
Hydroxyapatit (HA)	502,31	90 %	Sigma – Aldrich	1306-06-5
Oxid zirkoničitý (ZrO ₂)	123,22	93,5 %	Tosoh	1314-23-4
γ-oxid hlinitý (Al ₂ O ₃)	101,96	99,9 %	Inframat – Advanced materials	1344-28-1
Amoniak NH ₃ (vodný roztok)	35,05	~95 %	Lach-ner	1336-21-6

3.2 Příprava keramických suspenzí

Keramické suspenze, použité v této práci, se skládaly z vodného roztoku PVA, Dolapixu CE64, oktanolu, sacharózy a hydroxyapatitu, případně oxidu zirkoničitého. Konkrétní složení suspenzí je uvedeno v Tabulce 3.

3.2.1 Složení keramických suspenzí

Jako základe všech suspenzí byl použit vodný roztok PVA, které v roztoku funguje jako pojivo.

Další složkou suspenze byl Dolapix CE64, který slouží jako disperzant. Napomáhá kontinuálnímu rozložení částic hydroxyapatitu v suspenzi. V případě suspenze se ZrO_2 byl použit Darvan C-N.

Oktanol pomáhá eliminovat bubliny vznikající v suspenzi.

Sacharóza (kuchyňský cukr) pomáhá při mražení vytvořit lamely s lepšími mechanickými vlastnostmi a větším množstvím mezilamelárních můstků.

Poslední složkou je plnivo – hydroxyapatit nebo ZrO_2 . Použitý HA byl upraven kalcinací, což je proces eliminace uhličitánů z komerčně prodáváného prášku. Kalcinace byla provedena na vzduchu při teplotě 800 °C, po dobu 2 hodin.

3.2.2 Postup přípravy suspenze

Nejprve byl podle instrukcí výrobce připraven vodný roztok PVA. Bylo naváženo 9,61 g krystalků PVA a převedeno do 1000 ml deionizované vody. Následně byly krystalky PVA rozpuštěny ve vodní lázni o teplotě 97 °C.

Poté byla navážena sacharóza a kvantitativně převedena do přesného množství roztoku PVA. Roztok se sacharózou byl následně míchán, až do rozpuštění sacharózy. Takto připravený roztok byl kvantitativně převeden do plastové lahve s míchacími ZrO_2 kuličkami. Do roztoku bylo poté pipetou přidáno přesné množství Dolapixu CE64, případně Darvanu C-N a oktanolu. Postupně byl do suspenze dávkován HA, případně ZrO_2 a suspenze byla vždy průběžně promíchána. Složení jednotlivých variant, viz Tabulka 2.

V konečné fázi přípravy byla lahev uzavřena a umístěna na míchací válce, kde byla suspenze ponechána cca 24 hodin.

Označení vzorků, suspenze i následně připravených scaffoldů, je pro koncentraci hydroxyapatitu suspenzi. Suspenze s 7,5 % obj. odpovídá 7,5S, 10 % obj. odpovídá 10S atd.

Tabulka 3: Složení keramických suspenzí.

	7,5S		10S		15S		20S	
Chemikálie	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)
Hydroxyapatit	13,5	7,5	18,7	10,2	30,0	15,1	42,0	20,1
Polyvinylalkohol	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1
Voda	51,5	89,0	51,5	85,4	51,5	80,7	51,5	76,0
Disperzant	1,5	2,3	2,0	3,1	2,0	2,8	2,0	2,7
Oktanol	0,8	-	0,8	-	0,8	-	0,8	-
Sacharóza	2,1	-	2,3	-	2,6	-	3,0	-

3.2.3 Stabilita suspenzí

Stabilita suspenzí byla experimentálně prověřena pomocí sedimentační metody. Nejprve byla připravena sada odměrných válečků. Pro každou suspenzi byly ponechány dva válečky. Do všech válečků bylo následně napipetováno konstantní množství každé suspenze (10 ml). Poté byla změřena výška hladiny v každém válečku, v čase t_0 . Po 1 hodině bylo měření opakováno a byl zaznamenán výškový rozdíl mezi sedimentem a horní hladinou suspenze. Takto bylo měření opakováno ještě dvakrát, vždy s časovým intervalem 1 hodiny.

3.3 Aplikace metody freeze – casting

Prvním krokem bylo odvzdušnění dostatečně promíchané keramické suspenze, které bylo prováděno v exsikátoru, za pomoci vývěvy. Druhým krokem bylo nalití suspenze do předem nachlazených forem a následné umístění na chladicí desku. Hladina suspenze byla následně zakapána slunečnicovým olejem, aby suspenze během mrznutí nevysychala. Poté byl spuštěn program, který kontroluje a řídí teplotní gradient. Tato část procesu trvá do té doby, až suspenze promrzne k horní hladině (přibližně 2 hodiny) (Obrázek. 12).

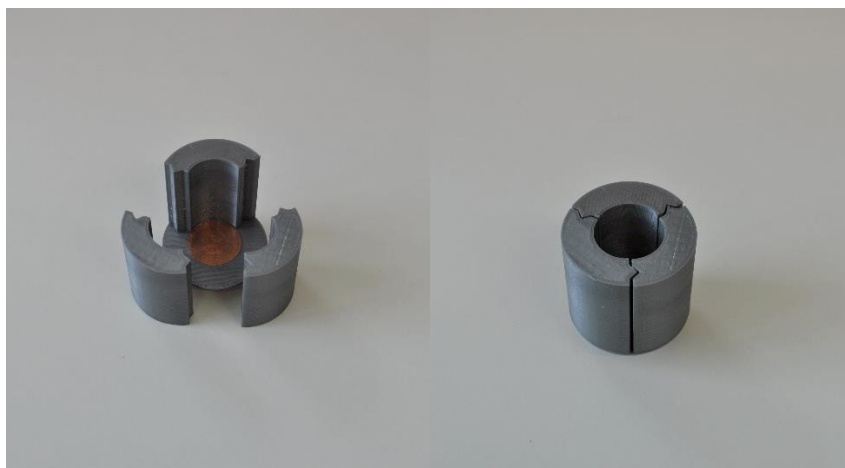
Po dokonalém promrznutí byly formy rozebrány, připravené válečky vyjmuty a následně umístěny do lyofilizátoru, kde probíhala sublimace ledových krystalků. Lyofilizace probíhala přibližně 16 hodin, přesné ukončení sublimace ovšem záviselo na hodnotě tlaku uvnitř exsikátoru a teplotě vzorků.



Obrázek 12: Freeze – casting aparatura s lyofilizátorem.

3.3.1 Popis forem

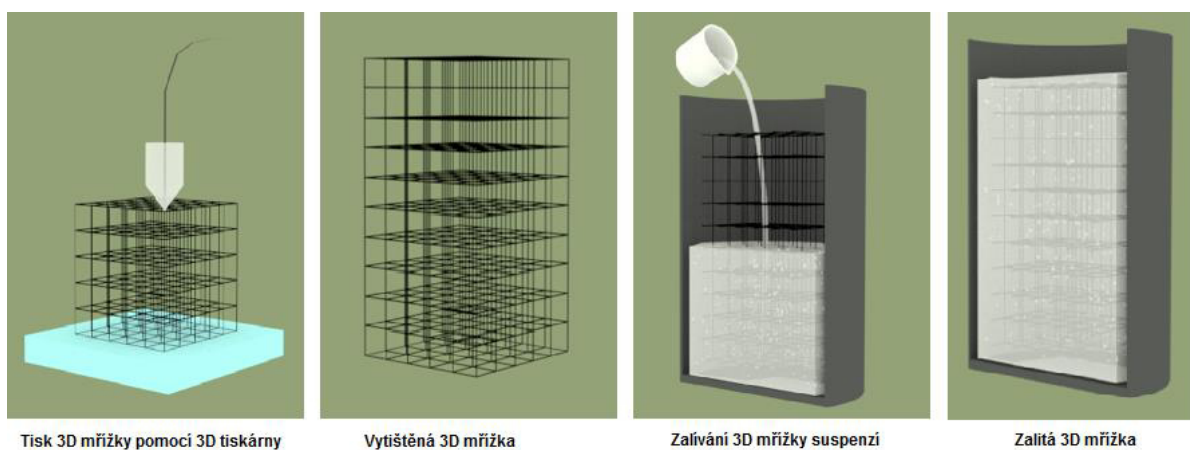
Formy byly nejprve navrženy a vytvořeny v 3D CAD programu a poté vytištěny pomocí 3D tiskárny. Materiál, který byl použit pro tisk je polykyselina mléčná (PLA). Formy, mají válcovitý tvar s vnitřním průměrem 25,4 mm a výškou 45,5 mm. Celá formy se skládá ze tří částí – dvou odnímatelných stěn a podstavy s upevněnou stěnou, viz Obrázek 13. Ve středu podstavy je vlepený měděný váleček, který zajišťuje co nejlepší přenos tepla mezi chladicí deskou a keramickou suspenzí.



Obrázek 13: Rozložená a složená forma používaná pro freeze-casting.

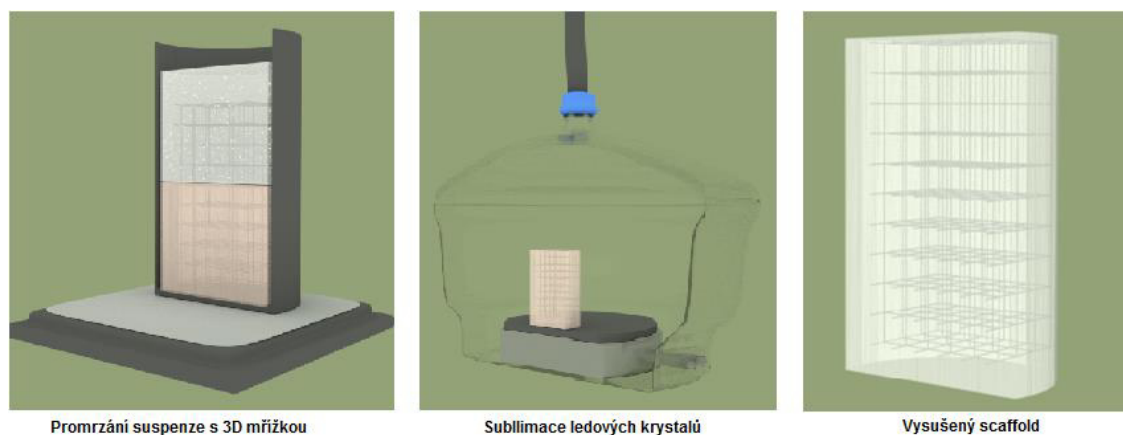
3.3.2 Implementace makrokanálků

V 3D CAD programu byla navržena a vytvořena a poté pomocí 3D tiskárny vytištěna 3D mřížka z PLA. Takto vytištěná 3D mřížka byla upevněna na dno složené formy. Následně byla celá mřížka zalita keramickou suspenzí (Obrázek 14). Objem mřížky byl stanoven na 4,5 ml.



Obrázek 14: Schéma procesu tisku a lití suspenze.

Poté byla forma umístěna na chladicí desku, kde byla ponechána do celkového promrznutí. Po promrznutí byla forma rozebrána a váleček vyjmut. Poté byl váleček umístěn do exsikátoru. Po lyofilizaci byl získán vysušený scaffold s 3D mřížkou (Obrázek 15).

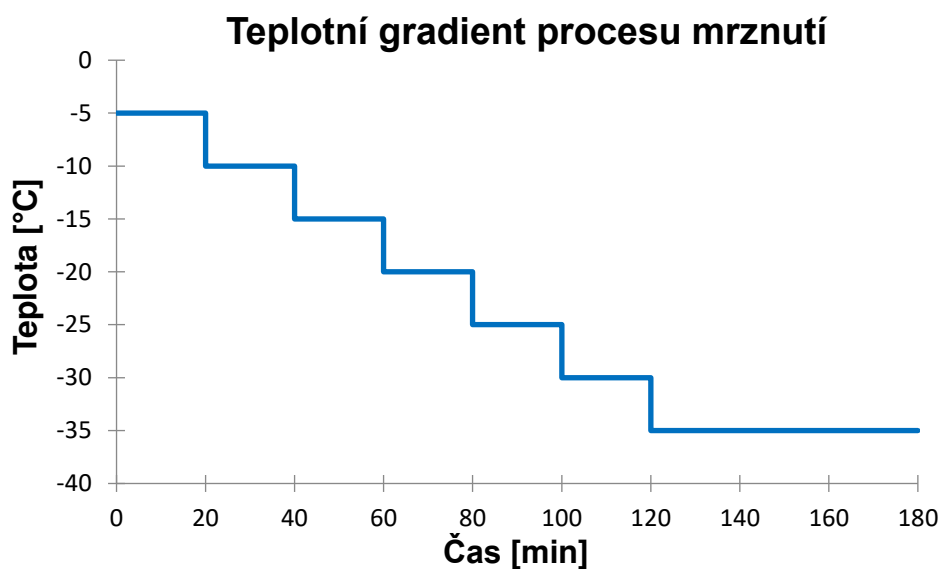


Obrázek 15: Schéma procesu metody freeze-casting.

3.3.3 Zvolený teplotní gradient mrznutí a následná lyofilizace

Při mrznutí byl zvolen teplotní gradient, viz Obrázek 16, který byl aplikován do doby celkového promrznutí.

Lyofilizace byla prováděna při tlaku 1 mbar po dobu 16 hodin s postupným nárůstem teploty.



Obrázek 16: Grafické znázornění teplotního gradientu procesu mrznutí.

3.4 Přelití připravených struktur hutnou vrstvou

Byly připraveny kompozity typu keramika/keramika.

Nejprve byly připraveny scaffoldy s 15 % HA. Poté byly připraveny keramické suspenze s HA, ZrO_2 a $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ podle postupu v kapitole 3.2.2. Složení suspenzí je ukázáno v Tabulce 3. Po dostatečném promíchání suspenze byly scaffoldy umístěny do speciální silikonové formy a následně přelity vrstvou hutné suspenze s HA nebo ZrO_2 . Hladina byla zakapána slunečnicovým olejem a ponechána ke kompletnímu vyschnutí na vzduchu.

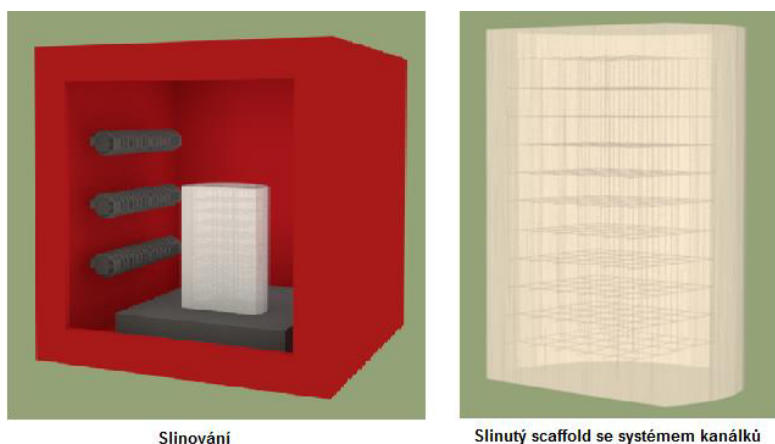
Takto připravené kompozity byly následně celkově slinuty.

Tabulka 4: Složení hutných suspenzí.

Chemikálie	20S4 (HA)		35S ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$)		31S (ZrO_2)	
	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)	Hmotnost (g)	Obj. zastoupení (% obj.)
HA / ZrO_2 / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	42,0	31,5	77,0	35	141,0	31,0
Polyvinylalkohol	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0
Voda	51,5	65,1	51,5	61,5	51,5	64,5
Disperzant	2,0	2,3	4,0	2,5	3,0	3,4
Oktanol	0,8	-	0,8	-	0,8	-
Sacharóza	4,0	-	5,5	-	6,5	-

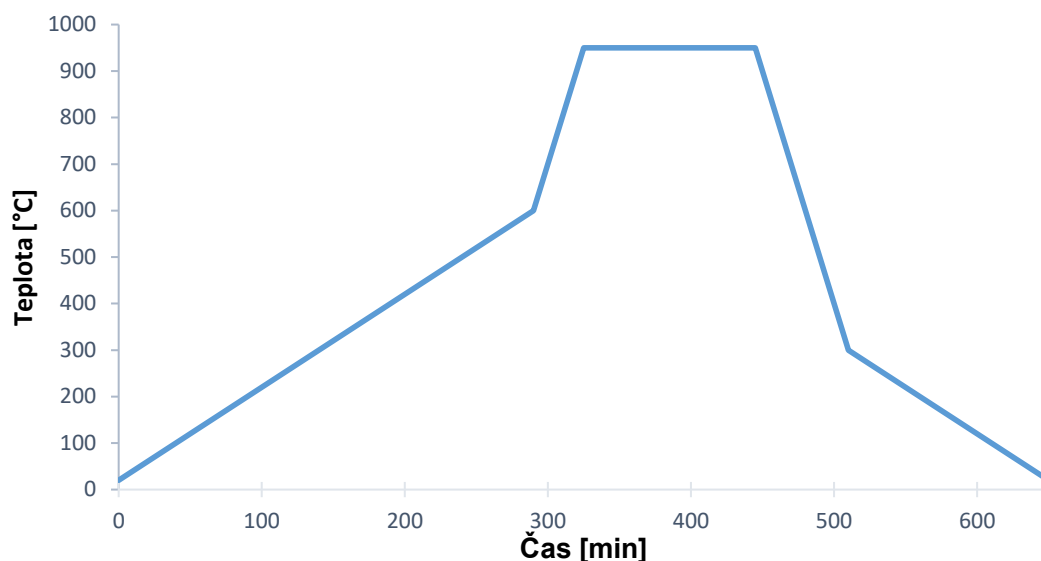
3.5 Slinování

V posledním kroku celého procesu bylo provedeno částečné slinutí. Připravené vzorky byly umístěny na speciální Al_2O_3 miskou a umístěny do pece. Poté byl scaffold ponechán k částečnému slinutí. Během slinování byla implementovaná mřížka odstraněna a vznikl tak systém kanálek, přímo ve scaffoldu (Obrázek 17).



Obrázek 17: Konečná fáze celkového procesu.

Následně byl zvolen přednastavený program, viz Obrázek 18, a vzorky byly slinuty.



Obrázek 18: Grafické znázornění procesu slinování.

3.6 Měření hustoty a porozity připravených scaffoldů

Byly zvoleny dva scaffoldy o stejné počáteční koncentraci HA – 15 % obj. Měření hustoty bylo provedeno pomocí Archimedovy metody (ČSN 623-2) Vzorky byly nejprve umístěny pod infralampu na cca 30 minut. Po vysušení a vychladnutí byly scaffoldy zváženy a byla zapsána hodnota suché hmotnosti m_s v gramech, s přesností na 4 desetinná místa. Poté byly umístěny do exsikátoru, kde byly pomocí vývěvy odvzdušněny po 30 minutách. Následně byly umístěny do kádinky s destilovanou vodou a smáčedlem. Hladina převyšovala válečky cca 1 cm. Pomocí vývěvy bylo následně smáčedlo vtlačeno do pórů. Tento proces trval dalších 30 minut. Poté byly válečky zváženy, v kapalině, umístěném košíčku a byla tak zjištěna hmotnost m_A . Současně byla odečtena i teplota. V posledním kroku byly válečky na povrchu osušeny a opět zváženy. Byla zapsána hodnota hmotnosti m_p . Nakonec byly scaffoldy opět umístěny pod infralampu na dosušení. Vypočet byl proveden pomocí vzorce:

$$\rho_{\text{rel}} = \frac{m_s \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}}{(m_p - m_A) \cdot \rho_{\text{teor}}} \cdot 100$$

Po každém slnutí byly všechny připravené scaffoldy také změřeny a zváženy. Z takto získaných hodnot pak byla vypočtena porozita.

Výpočtem byla u každého vzorku stanovena celková teoretická porozita scaffoldu. Pro výpočet byl použit vzorec:

$$\Pi = 1 - \frac{\rho_{\text{scaffold}}}{\rho_{\text{materiál}}}$$

3.7 Rtuťová porozimetrie

Byl připraven vzorek s požadovanými rozměry. Vzorek byl umístěn do skleněného penetrometru a bylo spuštěno měření. V přístroji byl nejprve vzorek evakuován a poté byly jeho póry postupně zaplňovány rtutí, přes normální tlaku, až do tlaku 0,3-0,4 MPa, což znamená do 4 μm velkých pórů. Poté byl vzorek přístrojem přesunut do vysokotlaké části přístroje, kde byla měřena intruze rtuti mezi atmosférickým tlakem a maximálním tlakem 414 MPa.

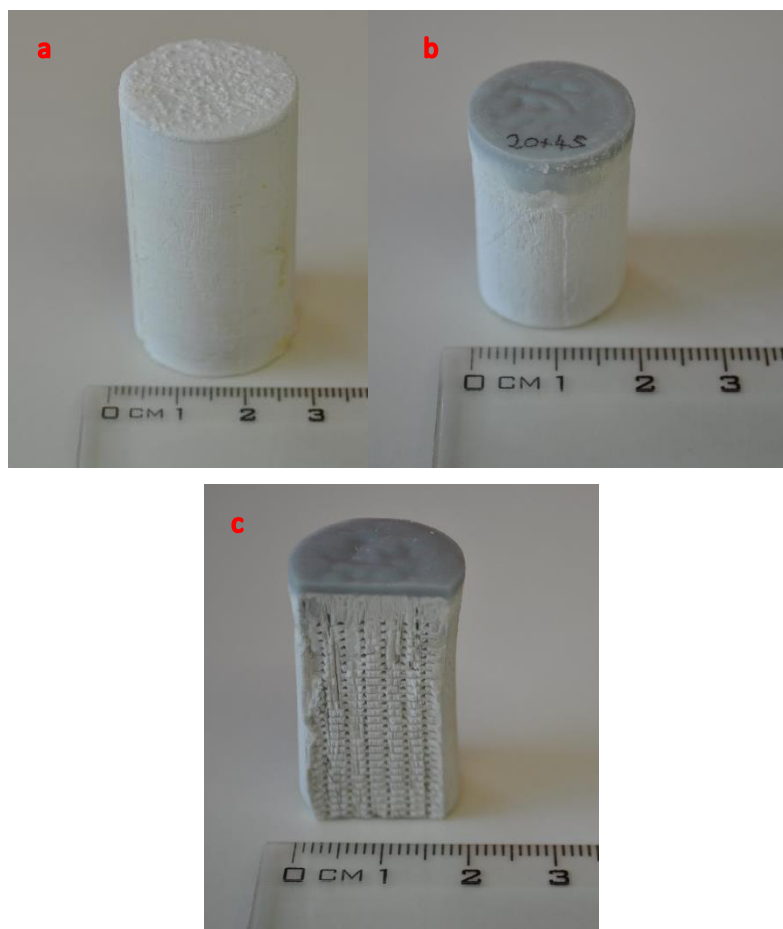
3.8 Rentgenová difraktometrie

Byl připraven vzorek pro RTG práškovou difraktometrie. Vzorek byl rozdrcen na prášek. Prášek byl následně umístěn do RTG difraktometru a bylo provedeno měření jeho povrchu. Měření bylo provedeno a RTG difraktometru Rigaku, při napětí 40 kV a proudu 30 mA. Jako zdroj RTG záření byla použita Cu anoda.

4. VÝSLEDKY

4.1 Popis připravených scaffoldů

Byly připraveny keramické kostní scaffoldy, válcovitého tvaru. Válce mají před slinutím průměr 25,4 mm. Průměrná hodnota průměru válečků je 23,5 mm. Průměrná výška válečků, po slinutí, bez implementovaných kanálků je 32,4 mm. Průměrná výška válečků, po slinutí, s implementovanými kanálky je 40,5 mm. Hmotnost slinutých scaffoldů se liší v závislosti na procentuálním zastoupení HA (Obrázek 19).



Obrázek 18: Připravené scaffoldy; a – celkový scaffold (zelené těleso); b – scaffold s přelitou hutnou vrstvou; c – scaffold s přelitou hutnou vrstvou a systémem kanálků

4.2 Obrazová analýza připravených scaffoldů

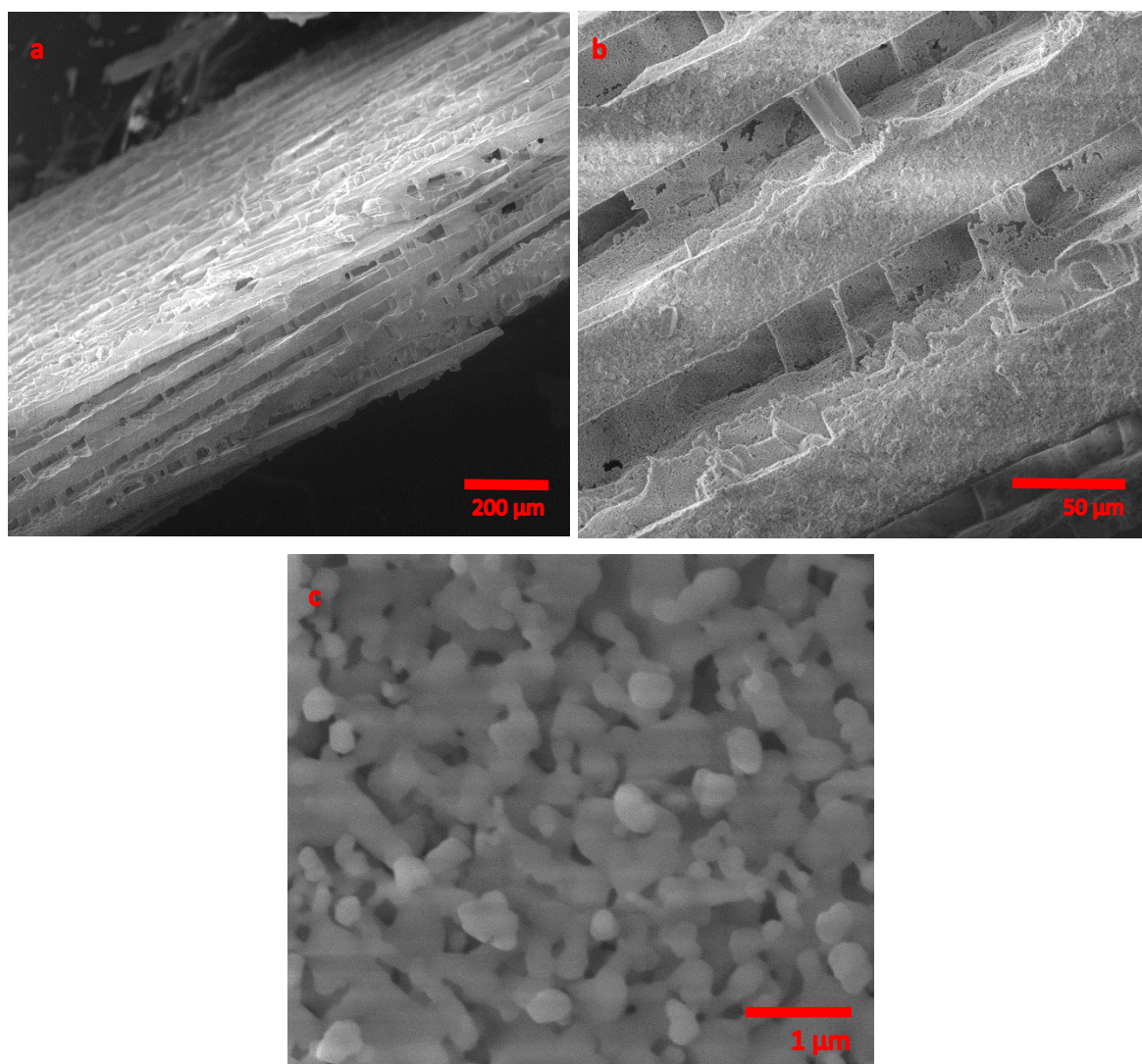
Obrazová analýza byla prováděna pomocí stereolupy a rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Obrazová analýza byla provedena pro každý typ scaffoldu. Pomocí stereolupy bylo možné pozorovat výslednou lamelární strukturu, distribuci lamel, mezilamelární můstky a jejich množství. Dále bylo možné změřit tloušťku lamel a velikost

mezilamelárních prostor. Průměrné hodnoty mezilamelárních prostor jsou uvedeny v následující Tabulce 5 a ve vztahu k celkové porositě na Obrázku 23.

Tabulka 5: Průměrné velikosti mezilamelárních prostor.

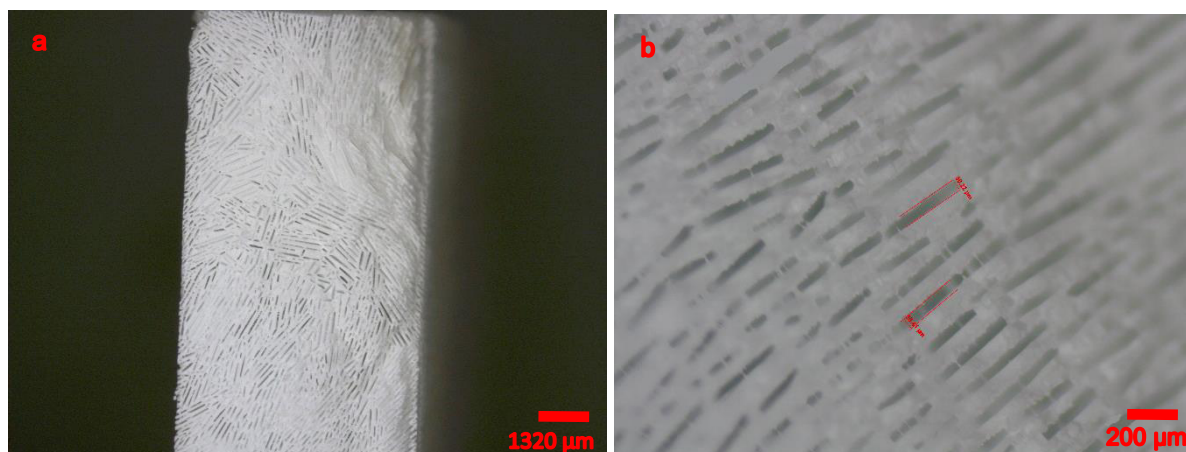
	7,5S	10S	15S	15S + PLA	20S
Průměrná velikost mezilamel. prostor (μm)	60,0	66,5	86,9	87,1 + 631,2	88,9

Na následujících snímcích je možné vidět snímky scaffoldů ze SEM. Tyto scaffoldy neobsahují systém kanálků, viz Obrázek 20.



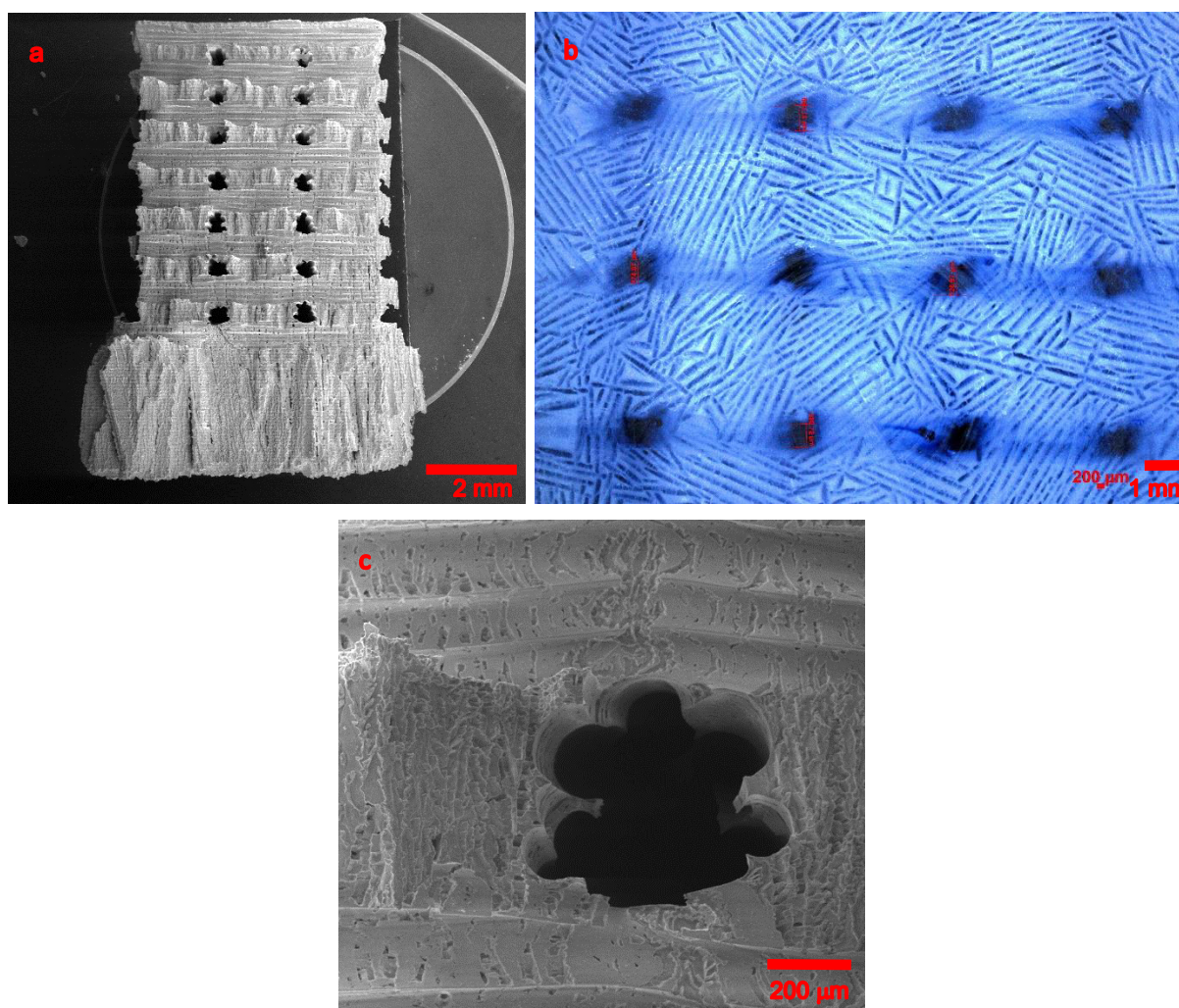
Obrázek 20: Snímky části připraveného scaffoldu; a – celková lamelární struktura; b – detail lamel a mezilamelárních prostor (15S); c – mikrostruktura s viditelnými mikropóry.

Na dalších snímcích je možno vidět povrch scaffoldu s viditelnou lamelárním typem pórů. Scaffoldy neobsahují kanálky a tyto snímky byly pořízeny pomocí stereolupy, viz Obrázek 21.



Obrázek 21: Snímky povrchu scaffoldu; a – celková viditelná lamelární struktura; b – detail lamel

Na těchto snímcích je možné vidět systém kanálků a jejich detail. Snímky byly pořízeny pomocí SEM a stereolupy, viz Obrázek 22.



Obrázek 22: Snímky implantovaného systému kanálků; a – celková struktura kanálků; b – vertikální pohled na systém kanálků; c – detail kanálku.

4.3 Hustoty scaffoldů

Každý vzorek byl po slinutí zvážen a změřen. Na základě těchto parametrů byla vypočtena hustota scaffoldu, která byla dále použita pro výpočet teoretické porozity.

Byla změřena hustota dvou scaffoldů a byl tak získány hodnoty pro výpočet hodnot, viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Naměřené a vypočtené hodnoty hustot scaffoldů.

	m_s [g]	m_A [g]	m_P [g]	t_{H_2O} [°C]	ρ_{H_2O}	ρ_{teor}	ρ_{rel}	ρ_{abs}
15S	9,2936	8,9169	24,1001	23,5	0,9974	3,08	19,82	0,6110
15S + PLA	3,8862	2,6789	9,4563	25,5	0,9969	3,08	17,79	0,5660

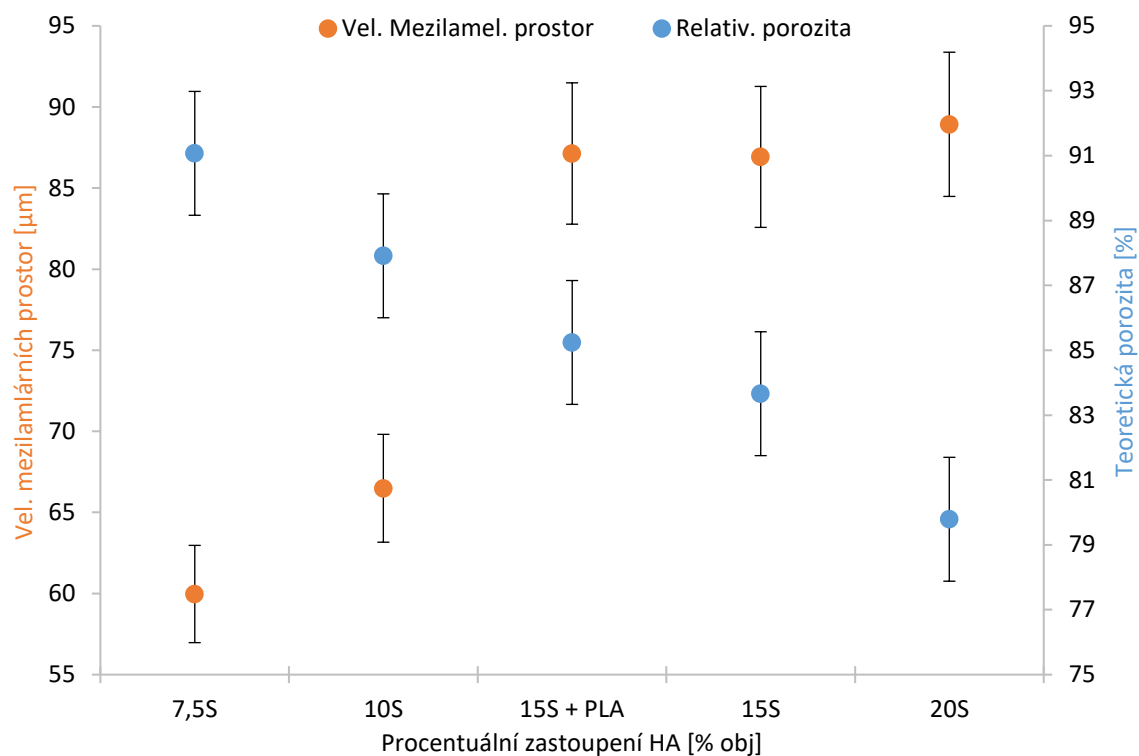
4.4 Porozita a distribuce pórů

Výpočtem byla u každého vzorku stanovena celková teoretická porozita scaffoldů, viz Tabulka 7, kde jsou uvedeny všechny průměrné hodnoty, příslušející k jednotlivým počátečním koncentracím HA.

Tabulka 7: Průměrné celkové porozity.

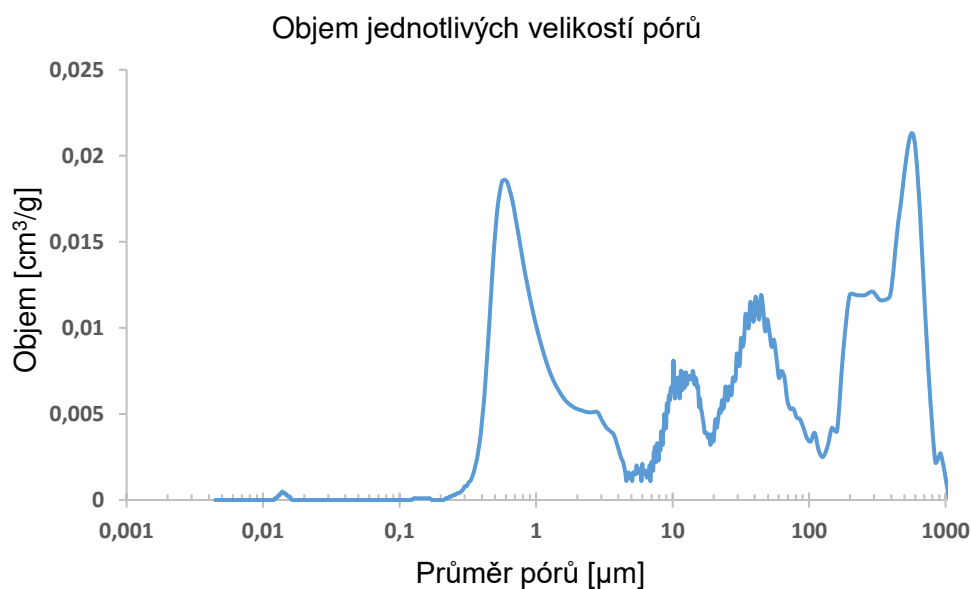
	7,5S	10S	15S	15S+ PLA	20s
Porozita (%)	91,07	87,91	83,66	85,24	79,79

Grafické znázornění závislosti celkové porozity a velikosti mezilamelárních prostor na procentuálním objemovém zastoupení hydroxyapatitu (před slinutím), viz Obrázek 23.



Obrázek 23: Grafické znázornění velikosti mezilamelního prostoru a teoretické porozity na procentuálním zastoupení HA.

Dále bylo provedeno měření intruze rtuti pomocí rtuťového porozimetru. Grafické znázornění zastoupení jednotlivých pórů, viz Obrázek 24. Nejvíce byly zastoupeny póry v rozmezí 0,2-2 μm , 10-20 μm , 30-50 μm a 200-800 μm .



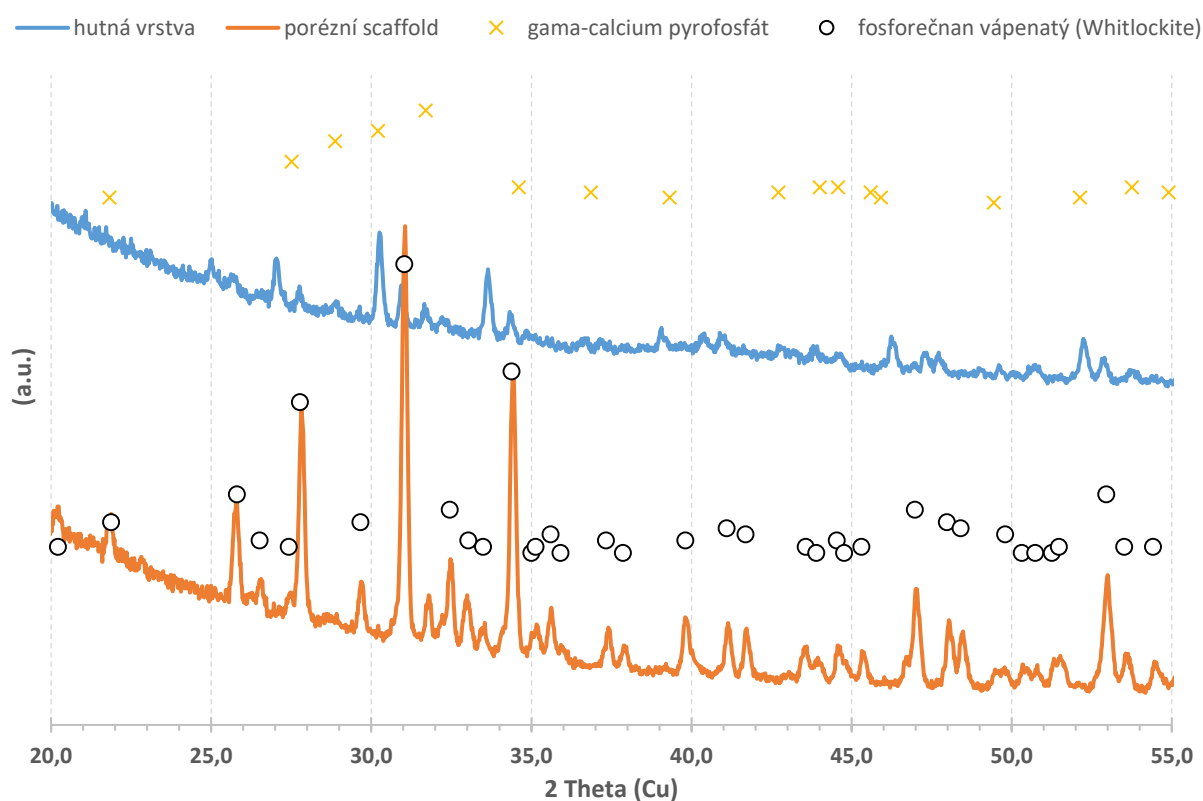
Obrázek 24: Grafické znázornění četnosti zastoupení jednotlivých velikostí pórů u vzorku 15S + PLA.

4.5 Stabilita suspenzí

Pomocí sedimentační metody byla určena stabilita suspenzí. Nejstabilnější suspenze byla určena podle nejmenšího rozdílu hladin sedimentu a roztoku nad ním. Jako nejstabilnější suspenze byla určena s 20 % obj. HA. Nejméně stabilní suspenze byla s 7,5 % obj. HA, přestože bylo přidáno několik kapek amoniaku, pro posunutí izoelektrického bodu

4.6 RTG difraktometrie

Pomocí RTG difraktometru bylo získáno difrakční spektrum vzorku, viz Obrázek 25. Poté byly výsledné píky porovnány s daty jednotlivých známých složek vzorku. Fázovou analýzou byla v části slinutých scaffoldů připravených metodou freeze-casting zjištěna jedna fáze β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Whitlockite), v oblasti přelité hutné vrstvy byly identifikovány dvě fáze γ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ a β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Whitlockite). Vymezení oblastí lze pozorovat na Obrázku 18c.



Obrázek 25: Difrakční spektrum vzorku z HA.

5. DISKUZE

Pomocí metody freeze-casting se podařilo připravit kostní scaffoldy válcovitého tvaru. Scaffoldy vykazují vysokou teoretickou porozitu. Problémem ovšem bylo vytvořit póry dostatečné velikosti. Dosažená velikost mezilamelárních prostor je v případě kostního scaffoldu limitující, z důvodu následné integrace vlastních kostních buněk do implantátu. Velikost pórů, v tomto případě mezilamelárních prostor, by měla podle studie provedené týmem Ciary M Murphy dosahovat minimální hodnoty 300 μm [33]. Dřívější výsledky uváděné v literatuře uvádějí nižší hodnoty v rozsahu 96-150 μm [33]. Vztah mezi velikostí pórů a buněčnou aktivitou ještě není zcela přesně popsán, a proto je určen minimální rozměr póru 300 μm . Námi maximální dosažený rozměr byl 102,3 μm , měřený jako mezilamelární vzdálenost.

Metodou freeze-casting byla maximální dosažená mezilamelární vzdálenost 102,3 μm , avšak průměrná hodnota byla ještě nižší, viz Tabulka 5. Avšak je to minimální rozměr daného póru a délka takto uvažovaného póru byla násobně vyšší. Navíc s vzrůstající porozitou klesala mezilamelární vzdálenost. Z těchto důvodů se přikročilo k úspěšné implementaci systému kanálků, které byly vytvořeny pomocí 3D mřížky, vytištěné na 3D tiskárně. Mřížka, která byla upevněna na dno formy před litím keramické suspenze, poté zamrzla v suspenzi a po lyofilizaci, při následném slinování byla mřížka vypálena. Vznikl tak systém kanálků s průměrnou velikostí 631,2 μm (měřeno opticky stereolupou). Výsledný průměr kanálků je tedy větší než minimální požadovaný průměr, uváděný v literatuře [33].

V grafickém znázornění (Obrázek 23) závislosti relativní porozity na objemovém zastoupení HA. V grafu lze vypořadovat, že vzniklý systém kanálků ovlivnil celkovou porozitu (nárůst z 83,7 na 85,2 % obj.), avšak nijak zásadně neovlivnil mezilamelární vzdálenost. Porozita vzrostla velmi málo, avšak je nutné si uvědomit, že se jedná o velmi porézní tělesa a vnesený prázdný objem (22 % obj. ve formě 3D mřížky) pouze nahradil již velmi porézní oblast. Pozitivním výsledkem je i zachování mezilamelárních vzdáleností po vnesení 3D mřížky, což ukázalo, že proces freeze-castingu nebyl nijak zásadně ovlivněn.

Následně byly tyto hodnoty změřené stereolupou porovnány s hodnotami naměřenými při rtuťové porozimetrii, viz Obrázek 24. Tato metoda uvažuje při použitém modelu s celulárním tvarem pórů, což neodpovídá reálné situaci, viz Obrázky 19 a 21. Ačkoliv je tímto měření lehce zkreslené, lze vypořadovat tři oblasti velikostí pórů: rozmezí 0,2-2 μm odpovídá mikroporozitě (viz Obrázek 19c), rozmezí 10-20 μm a 30-50 μm odpovídá mezilamelární vzdálenosti (viz Obrázek 19b), a rozmezí 200-800 μm odpovídá vnesenému systému kanálků (viz Obrázek 21).

Po vytvoření kompozitu s hutnou vrstvou, která měla shodné počáteční fázové složení, byla provedena RTG difrakční analýza složení vzorku HA po slinování na 1200 °C/2 hodiny. Tato analýza odhalila očekávanou fázovou přeměnu HA na beta formu fosforečnanu vápenatého ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) u lamelární struktury. Krystalograficky se jednalo o whitlockite, který se běžně používá jako kostní výplň. Ovšem, hutná část vzorku měla rozdílné fázové složení a obsahovala zejména γ -calcium pyrofosfát, viz Obrázek 25. Tento jev je obtížné vysvětlit a bude dále zkoumán.

Jedním z omezení použité metody freeze-castingu k dosažení vysoké porozity je stabilita počátečních suspenzí. Námi dosažená nejnižší koncentrace HA v počáteční suspenzi byla s 7,5 % obj. a suspenze s nižším obsahem HA se jevily jako nestabilní (určeno sedimentační metodou). Tato suspenze měla nevyšší relativní porozitu, avšak mechanická stabilita po slinutí se jevila jako velmi malá, docházelo k drolení lamel atp. Proto byla k dalším experimentům používána suspenze s obsah HA 15 % obj., která je mechanicky stabilní. Vnesení 3D mřížky do porézní HA struktury bude mít dvě omezení, první je schopnost připravit velmi malé kanálky (dáno technikou 3D tisku) a druhou je schopnost odstranit velmi objemné kanálky během slinování. Vzhledem k tomu, že naším cílem je vnesení kanálků větších než 300 μm , není první omezení problémem. Limity pro odstranění velkého objemu polymerní 3D mřížky zatím nebyly testovány. Uvedený postup je unikátní v použití nepřímého 3D tisku v kombinaci s metodou freeze-casting [17].

Další oblastí výzkumu byla kombinace metod freeze-casting a odlévání. Námi zvolený postup přípravy kompozitů se liší od postupů uváděných v literatuře [5]. Byl tak vytvořen kompozit, který byl vždy tvořen zeleným tělesem s 15S, který byl následně, na vrchní straně válce, přelit hutnou suspenzí. Při vytváření kompozitů, bylo problematické namíchat takovou keramickou suspenzi, která se do scaffoldu lehce vsákne a současně vytvoří hutnou vrstvu. Tento výzkum je v počátcích a doposud se podařilo vyřešit spojení odlité vrstvy s lamelární strukturou scaffoldu pro kompozit, typu hydroxyapatit/hydroxyapatit, viz Obrázek 18c. Největším problémem u dalších kompozitů (hydroxyapatit/ ZrO_2 a hydroxyapatit/ Al_2O_3) bylo rozdílné smrštění v průběhu slinování a je třeba další optimalizace procesu přípravy těchto kompozitů.

6. ZÁVĚR

V této práci se podařilo experimentálně ověřit možnosti přípravy scaffoldů použitelných k přípravě kostních náhrad metodou freeze-casting.

Tato metoda umožnila připravit scaffoldy s porozitou vyšší než 90 % obj. a dostatečnou mechanickou stabilitou.

Pomocí implementace 3D polymerní mřížky se navíc podařilo dosáhnout kontrolované systému kanálku s průměrnou velikostí 600 μm , přičemž tvorba lamelární struktury nebyla ovlivněna.

Rtuťovou porozimetrií bylo ověřeno, že vybraný scaffold obsahuje tři typy pórů, jeden v oblasti 1 μm (póry mezi částicemi HA), druhý v oblasti 30 μm (vzniklé lamely) a třetí v oblasti 600 μm (vnesená 3D mřížka).

Metoda freeze-casting především v kombinaci s dalšími technikami jako je nepřímý 3D tisk a odlévání poskytuje vysokou variabilitu vnitřní porozity a její struktury, která je nutná pro úspěšnou přípravu kostních náhrad.

7. LITERATURA

- [1] CARTER, C. Barry. a M. Grant. NORTON. *Ceramic materials: science and engineering*. New York, 2007. ISBN 03-874-6270-8.
- [2] GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-726-2311-7.
- [3] KŘIVÁNKOVÁ, Markéta a Milena HRADOVÁ. *Somatologie: učebnice pro střední zdravotnické školy*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2988-6.
- [4] MÜLLER, Werner E.G., Xiaohong WANG, Bärbel DIEHL-SEIFERT, et al. Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca² level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomaterialia*. 2011, **7**(6), 2661-2671. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.007. ISSN 17427061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270611100119X>
- [5] Mirkoskopická stavba kostní tkáně. *Wikipedia: Wikiskripta* [online]. [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Mikroskopick%C3%A1_stavba_kostn%C3%AD_tk%C3%A1n%C4%9B
- [6] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMÁN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1415-1.
- [7] Osteoporóza. *Zdravotnický deník* [online]. [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: <http://www.zdravotnickydenik.cz/2014/10/lekarnici-poradi-pacientum-s-osteoporozou-a-zeptaji-se-jich-co-o-ni-vedi/>
- [8] REZWAN, K., Q.Z. CHEN, J.J. BLAKER a Aldo Roberto BOCCACCINI. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, **27**(18), 3413-3431. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206001232>
- [9] HUTMACHER, Dietmar W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000, **21**(24), 2529-2543. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961200001216>

- [10] WANG, H., LI, Y., ZUO, Y., LI, J., MA, S., CHENG, L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2007, vol. 28, pp. 3338.
- [11] PICONI, C. a G. MACCAURO. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999, **20**(1), 1-25. DOI: 10.1016/S0142-9612(98)00010-6. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961298000106>
- [12] SHEN, Z. J., ADOLFSSON, E., NYGREN, M., GAO, L., KAWAOKE, H. K. NIIHARA, K. (2001), Dense Hydroxyapatite–Zirconia Ceramic Composites with High Strength for Biological Applications. *Adv. Mater.*, 13: 214–216. doi:10.1002/1521-4095(200102)13:3<214::AID-ADMA214>3.0.CO;2-5
- [13] STUART, Andre R., Urs T. GONZENBACH, Elena TERVOORT a Ludwig J. GAUCKLER. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society*. 2006, **89**(6), 1771-1789. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x. ISSN 0002-7820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>
- [14] KARAGEORGIOU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005, **26**(27), 5474-5491. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205001511>
- [15] TANG, Yufei, Qian MIAO, Kang ZHAO, Minke ZHU a Zixiang WU. Random stacking template of polymer spheres and water soluble particles to fabricate porous hydroxyapatite with interconnected pores. *Ceramics International*. 2014, **40**(5), 6631-6638. DOI: 10.1016/j.ceramint.2013.11.120. ISSN 02728842.
- [16] STUART, Andre R., Urs T. GONZENBACH, Elena TERVOORT a Ludwig J. GAUCKLER. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society*. 2006, **89**(6), 1771-1789. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x. ISSN 0002-7820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>
- [17] HOUBEN, Annemie, Jasper VAN HOORICK, Jürgen VAN ERPS, Hugo THIENPONT, Sandra VAN VLIERBERGHE a Peter DUBRUEL. Indirect Rapid Prototyping: Opening Up Unprecedented Opportunities in Scaffold Design and Applications. *Annals of Biomedical Engineering*. 2017, **45**(1), 58-83. DOI:

- 10.1007/s10439-016-1610-x. ISSN 0090-6964. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s10439-016-1610-x>
- [18] SIGMUND, Wolfgang M., Nelson S. BELL a Lennart BERGSTRÖM. Novel Powder-Processing Methods for Advanced Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 2000, **83**(7), 1557-1574. DOI: 10.1111/j.1151-2916.2000.tb01432.x. ISSN 00027820. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.2000.tb01432.x>
- [19] DEVILLE, Sylvain, Sylvain MEILLE a Jordi SEUBA. A meta-analysis of the mechanical properties of ice-templated ceramics and metals. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2016, **16**(4), 043501-. DOI: 10.1088/1468-6996/16/4/043501. ISSN 1468-6996. Dostupné také z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1088/1468-6996/16/4/043501>
- [20] KURAPOVA, O.Yu. et al., Cryochemical methods for manufacturing nanosized ceramics and ceramic precursor powders with low agglomeration degree: A review. *Reviews on advanced materials science*. 2012. Vol. 32, issue 2, p. 112-132.
- [21] KIM, J.H., J.H. LEE, T.Y. YANG, S.Y. YOON, B.K. KIM a H.C. PARK. TBA-based freeze/gel casting of porous hydroxyapatite scaffolds. *Ceramics International*. 2011, **37**(7), 2317-2322. DOI: 10.1016/j.ceramint.2011.03.023. ISSN 02728842. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884211001349>
- [22] DEVILLE, Sylvain, Eduardo SAIZ a Antoni P. TOMSIA. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, **27**(32), 5480-5489. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.028. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206005801>
- [23] FU, Qiang, Mohamed N RAHAMAN, Fatih DOGAN a B Sonny BAL. Freeze-cast hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Biomedical Materials*. 2008, **3**(2), 025005-. DOI: 10.1088/1748-6041/3/2/025005. ISSN 1748-6041. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1748-605X/3/i=2/a=025005?key=crossref.c45149d2a5ecae4de0c222298c64b41a>
- [24] DEVILLE, Sylvain, Eric MAIRE, Audrey LASALLE, Agnès BOGNER, Catherine GAUTHIER, Jérôme LELOUP a Christian GUIZARD. In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particle Suspensions-Part I: Initial Instants. *Journal of the American Ceramic Society*.

- 2009, **92**(11), 2489-2496. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.03163.x. ISSN 00027820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2009.03163.x>
- [25]DEVILLE, Sylvain, Eric MAIRE, Audrey LASALLE, Agnès BOGNER, Catherine GAUTHIER, Jérôme LELOUP a Christian GUIZARD. In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particles Suspensions. Part II: Steady State. *Journal of the American Ceramic Society*. 2009, **92**(11), 2497-2503. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.03264.x. ISSN 00027820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2009.03264.x>
- [26]PEPPIN, Stephen S.L., M. Grae WORSTER a J.S. WETTLAUFER. Morphological instability in freezing colloidal suspensions. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2007-3-8, **463**(2079), 723-733. DOI: 10.1098/rspa.2006.1790. ISSN 1364-5021. Dostupné také z: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspa.2006.1790>
- [27]BAREGGI, Andrea, Eric MAIRE, Audrey LASALLE a Sylvain DEVILLE. Dynamics of the Freezing Front During the Solidification of a Colloidal Alumina Aqueous Suspension: In Situ X-Ray Radiography, Tomography, and Modeling. *Journal of the American Ceramic Society*. 2011, **94**(10), 3570-3578. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2011.04572.x. ISSN 00027820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2011.04572.x>
- [28]MUNCH, Etienne, Eduardo SAIZ, Antoni P. TOMSIA a Sylvain DEVILLE. Architectural Control of Freeze-Cast Ceramics Through Additives and Templating. *Journal of the American Ceramic Society*. 2009, **92**(7), 1534-1539. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.03087.x. ISSN 00027820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2009.03087.x>
- [29]DEVILLE, Sylvain, Eduardo SAIZ a Antoni P. TOMSIA. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, **27**(32), 5480-5489. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.028. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206005801>
- [30]DEVILLE, S. Freezing as a Path to Build Complex Composites. *Science*. 2006, **311**(5760), 515-518. DOI: 10.1126/science.1120937. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1120937>

- [31]DEVILLE, S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. *Advanced Engineering Materials*. 2008, **10**(3), 155-169. DOI: 10.1002/adem.200700270. ISSN 14381656. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adem.200700270>
- [32]FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998, **45**(3), 221-229. DOI: 10.1016/S0939-6411(98)00004-6. ISSN 09396411. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641198000046>
- [33]MURPHY, Ciara M. a Fergal J. O'BRIEN. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion*. 2014, **4**(3), 377-381. DOI: 10.4161/cam.4.3.11747. ISSN 1933-6918. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.4.3.11747>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ALP	enzym alkalická fosfatáza
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAD	Computer Aided Design
CT	počítačová tomografie
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HA	hydroxyapatit
PGA	polyglykolid
PLA	polylaktid
PTH	protein uvolňující parathyroid hormon
RTG	označení pro rentgenové záření
SEM	Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie